

Chemische und ökologische Studien an Nordseeschwämmen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe–Universität in Frankfurt am Main

von
Heidi Zanker
aus Geislingen/Steige

Bremerhaven 2004

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe–Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

1. Gutachter: PD Dr. Matthias Köck

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Göbel

Datum der Disputation: 25.01.2005

Bedenkt, dass alle Geschöpfe dieser Welt perfekt sind und
darum entsprechend behandelt werden wollen.

(nach HEHAKA SAPA, Sioux)

One day 30 years ago, Swift Eagle, an Apache man, visited some friends on the Onondaga Indian Reservation in central New York. While he was out walking, he heard sounds of boys playing in the bushes. They had been shooting small birds with a gun. A non-Indian bird lover might have given a stern lecture on the evil of killing birds; threaten to tell the boys' parents on them for doing something they had been told not to do; or even spank them. Swift Eagle, however, did something else. "Ah," he said, "I see you have been hunting. Pick up your game and come with me." He led the boys to a place where they could make a fire and cook the birds. He made sure they said 'thank you' to the spirits of the birds before eating them, and as they ate he told stories. It was important, he said, to be thankful to the birds for the gifts of their songs, their feathers, and their bodies as food. "Our Creator gave the gift of life to everything that is alive. Life is a very sacred thing. It is permitted to hunt to feed ourselves and our people. So I understand that you boys must have been very, very hungry to kill those little birds."

Für die Schwämme

NICHTS IST ZU WUNDERBAR
UM WAHR ZU SEIN

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	SCHWÄMME (PORIFERA) ALS NATURSTOFFPRODUZENTEN	1
1.1	Schwammbiologie	1
1.1.1	Morphologie	1
1.1.2	Taxonomie	4
1.2	Schwammökologie	6
1.2.1	Lebensraum Orkney- und Shetland Inseln (Nordsee)	6
1.2.1.1	Tuquoy Bay	8
1.2.1.2	Saviskaill Bay	9
1.2.1.3	Red Nev	9
1.2.1.4	Shetland-Inseln	10
1.2.2	Lebensraum und assoziierte Organismen	11
1.2.3	Chemische Ökologie	12
1.2.4	Bedeutung für den Menschen	14
1.3	Schwammchemie	15
1.3.1	Naturstoffe aus Schwämmen	15
1.3.2	Biologisch aktive Metaboliten	20
2.	METHODIK	21
2.1	Fragestellung	21
2.2	Probennahme	22
2.3	Chemische Methoden	24
2.3.1	Chromatographische Methoden	24
2.3.2	Spektroskopische Methoden	24
2.4	Biotests	26
2.4.1	Toxizitätstests	26
2.4.2	Phytagelversuch	27
2.4.3	PTK-Test	28
2.4.4	Hemmhoftest	29

2.5	Weiterführende Versuche	29
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	30
3.1	Vergleichende chemische Studien der Nordseeschwämme	30
3.1.1	Extraktion der Schwammarten	30
3.1.2	HPLC-Analyse der Rohextrakte.....	31
3.1.3	NMR-Analyse der Rohextrakte.....	34
3.1.4	Isolierung und Identifizierung der “Hauptmetaboliten“	36
3.1.5	Metabolitenfreisetzung.....	40
3.1.6	Inter- und intraindividuelle Unterschiede im Metabolitengehalt	41
3.2	Biologie der untersuchten Nordseeschwämme	44
3.2.1	Schwammassoziierte Mikroorganismen	44
3.2.2	Schwammassoziierte Makroorganismen.....	46
3.3	Biologische Aktivität der untersuchten Nordseeschwämme	52
3.3.1	Antilarvale Aktivität.....	52
3.3.1.1	Toxizität gegenüber Schwammlarven (<i>Halichondria panicea</i>).....	52
3.3.1.2	Toxizität gegenüber Ascidienlarven (<i>Polyclinum aurantium</i>).....	53
3.3.1.3	Toxizität gegenüber Crustaceenlarven (<i>Carcinus maenas</i> & <i>Artemia salina</i>)...	54
3.3.1.4	Zusammenfassung der Larventoxizität	56
3.3.2	<i>Antifouling</i> -Wirkung	57
3.3.3	Antibakterielle Aktivität.....	62
3.3.4	Enzyminhibition (Protein-Tyrosin-Kinase-Test)	68
3.3.5	Cytotoxische Aktivität.....	72
3.3.6	Zusammenfassung der biologischen Aktivität	74
3.3.7	Korrelationen und Vergleich zwischen Demospongiae und Calcarea	78
3.4	Chemie einzelner Schwammarten	80
3.4.1	<i>Isodictya palmata</i>	80
3.4.2	<i>Phakellia ventilabrum</i>	84
3.4.3	<i>Myxilla fimbriata</i>	86

3.5	Chemische Ökologie von <i>Pachymatisma johnstonia</i>	89
3.5.1	Identifizierung der Hauptmetaboliten	89
3.5.2	Variabilität	93
3.5.3	Lokalisierung der Metaboliten	96
3.5.4	Assoziierte Organismen	97
3.5.5	Biologische Aktivität	99
3.5.5.1	Toxizität	99
3.5.5.2	Antibakterielle Aktivität	100
3.5.5.3	Enzyminhibition	101
4.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	103
5.	EXPERIMENTELLER TEIL	108
5.1	Chemische Methoden	108
5.1.1	Extraktion und Fraktionierung	108
5.1.2	Metabolitenisolierung und –identifizierung	108
5.1.2.1	Chromatographische Methoden	108
5.1.2.2	Spektroskopische Methoden	111
5.1.3	Metabolitenquantifizierung	112
5.1.4	Metabolitenfreisetzung	112
5.2	Schwammpartitionierung	113
5.2.1	Anfertigung von Nadelpräparaten	113
5.2.2	Trennung der Schwammschichten	113
5.2.3	Trennung von Schwamm- und Bakterienzellen	113
5.2.4	Bakterienzählung	114
5.3	Schwammhälterung	116
5.4	Biotests	117
5.4.1	Antilarval-Biotests	117
5.4.1.1	Toxizität gegenüber Schwammlarven (<i>Halichondria panicea</i>)	118
5.4.1.2	Toxizität gegenüber Ascidienlarven (<i>Polyclinum aurantium</i>)	119

5.4.1.3	Toxizität gegenüber Crustaceenlarven (<i>Carcinus maenas</i>)	119
5.4.1.4	<i>Brine-shrimp-assay</i> (Toxizität gegenüber <i>Artemia salina</i>).....	119
5.4.2	Phytageiversuche (<i>Antifouling</i> -Wirkung)	120
5.4.3	Agardiffusionstest (antibakterielle Aktivität).....	122
5.4.4	Protein-Tyrosin-Kinase-Test (Enzyminhibition)	124
5.4.5	Cytotoxizitätstest.....	126
5.4.6	Statistische Methoden	126
6.	LITERATURVERZEICHNIS	127
7.	ANHANG	141

LEBENS LAUF

ABKÜRZUNGEN UND ERLÄUTERUNGEN

Abb.	Abbildung
AI	Aktivitätsindex
ACN	Acetonitril
C	Konzentration
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
d	Doublett
DAPI	Diamidinophenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
D _I	Innendurchmesser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EA _R	Enzymrestaktivität
ESI-TOF	<i>electrospray ionization time-of-flight</i>
FG	Frischgewicht
g	Gravitationskraft
GPS	<i>global positioning system</i>
H	Höhe
HCL	Salzsäure
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
kA	keine Angaben
Kap.	Kapitel
LC	<i>liquid chromatography</i>
LCT	<i>liquid chromatography-orthogonal-time-of-flight-mass spectrometry</i>
LPLC	<i>low pressure liquid chromatography</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
N	Nord (bezogen auf geographischen Breitengrad)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

NP	Normalphase
Q-TOF	<i>quadrupole time-of-flight</i>
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
THF	Tetrahydrofuran
t _R	Retentionszeit
ppm	<i>parts per million</i>
PVC	Polyvinylchlorid
RP	<i>reversed phase</i>
S.	Seite
s	Singulett
SD	Standardabweichung
sp.	Spezies
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
UV	Ultraviolett
VLC	<i>vacuum liquid chromatography</i>
vgl.	vergleiche
vw	very weak (sehr schwache Kopplungseffekte bezogen auf NMR-Experimente)
w	weak (schwache Kopplungseffekte bezogen auf NMR-Experimente)
W	West (bezogen auf geographischen Längengrad)

Das Wort „Porifera“ stammt aus dem Lateinischen (porus=Pore, Öffnung und ferre=tragen) und bedeutet wörtlich Porenträger. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Nennung der für die jeweiligen Arten gültigen Erstbeschreiber im Text verzichtet. Diese und alle anderen erwähnten Taxa (Gattungen, Arten) mit Angaben zur Klassifizierung sind dem Anhang zu entnehmen.

Alle Fotos und Abbildungen stammen vom Verfasser dieser Arbeit, soweit dies nicht anders angegeben wurden.

Die Signale der abgebildeten Chromatogramme wurden mit einem Lichtstreuendetektor aufgezeichnet. Abweichungen von dieser Detektionsmethode sind im Text entsprechend angemerkt. Die im Anhang abgebildeten NMR-Spektren der Rohextrakte sind in ihrer Formatierung an die jeweilige Signalstärke angepasst.

Die vorliegende Arbeit wurde am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven in der Sektion Chemie mariner Spuren- und Naturstoffe in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Matthias Köck unter seiner Anleitung in der Zeit von Februar 2001 bis Juli 2004 angefertigt.

Bei Herrn PD Dr. Matthias Köck bedanke ich mich für den Arbeitsplatz und die Bereitstellung des Themas der Doktorarbeit. Dadurch hatte ich die Möglichkeit an einer Reihe von Forschungsfahrten teilzunehmen, sowie die Forschungstaucherausbildung zu absolvieren. Auch möchte ich mich für sein Interesse an der Schwammforschung und sein Engagement bei der Strukturaufklärung isolierter Substanzen bedanken

Herrn Professor Dr. Michael Göbel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein Dankeschön geht auch an meine Laborkollegen und Mitdoktoranden in Bremerhaven. Vielen Danke liebe Ellen, für die unzähligen Stunden die du für mich an der HPLC verbracht hast. Maren, Jana – es war mir ein Vergnügen die Biotests mit Euch durchzuführen. Besten Dank auch an Christian, Achim und Sven, die mir bei chemischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern Meeresstation Helgoland, für jegliche Art der Hilfestellung und eine stets konstruktive Zusammenarbeit. Besonders Gunnar Gerds und Antje Wichels haben mich während der "Heinckefahrten" und der Versuche auf Helgoland immer mit Rat, Tat und Freundschaft unterstützt. „Die Tauchers“ Udo Schilling und Carsten Wanke waren mir bei den Probennahmen stets eine große Hilfe. Udo danke ich außerdem für die Überlassung besonders schöner Fotos.

Bedanken möchte ich mich auch bei Ralph Kühlenkamp and Mario de Kluijver für ihre Hilfe bei der Taxonomie der Orkney und Shetland Flora und Fauna.

Thorsten danke ich für sämtliche Hilfen am Computer. Er war stets zur Stelle, auch wenn es (fast schon zu) spät war.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Andrea für ihre tatkräftige Hilfe auf der Heinckefahrt 2003 und die moralische und fachliche Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für ALLES.

1. SCHWÄMME ALS NATURSTOFFPRODUZENTEN

1.1 Schwammbiologie

1.1.1 Morphologie

Schwämme zählen zu den ursprünglichsten vielzelligen Organismen unseres Planeten. Seit Millionen von Jahren besiedeln sie alle aquatischen Habitate. Obwohl auch dieses Taxon am Ende der Trias vom großen Artensterben betroffen war, kam es schnell zu einer erneuten Radiation. Heute sind die sessilen Filtrierer im Gezeitenbereich, genauso wie in der Tiefsee, von den Tropen bis zu den Polargebieten, im Süß- und Salzwasser heimisch. Totipotente Zellen (Archaeocyten) verleihen den Schwämmen ein hohes Maß an Plastizität. Das macht sie in Gestalt (schlauch-, becher-, pilz-, krustenförmig, veränderliches Farbmuster) und Größe (Arten von wenigen mm bis über 3 m Höhe) variabel und ermöglicht es ihnen, die Wuchsform an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen (Hooper & van Soest 2002). Abgesehen vom Adaptationsvermögen im Bereich der Physiologie und Fortpflanzung hat auch die Evolution chemischer Abwehrmechanismen dazu beigetragen, dass sich Schwämme über Jahrtausende so erfolgreich in verschiedenen Lebensräumen etablieren konnten (siehe Abb. 1.1a-f).

Den wissenschaftlichen Namen Porifera GRANT, 1836 verdanken die Schwämme ihrer besonderen Morphologie. Tausende von Poren durchsetzen die Körperoberfläche und führen in ein Kanalsystem, das Funktionen bei der Atmung, Ernährung, Exkretion und Fortpflanzung wahrnimmt. Im Unterschied zu anderen Metazoen haben Schwämme keine Sinnes- und Nervenzellen. Sie besitzen weder lokalisierbare Gonaden, noch echte Epithelien. Dafür verfügen sie über unterschiedlich spezialisierte Zelltypen, die in der Lage sind, sich zu lockeren Verbänden zusammen zu schließen (Ax 1995). Umgeben wird der Schwammkörper von einer aus Pinacocyten gebildeten Außenschicht, dem Pinacoderm. Das Choanoderm kleidet die Kanalwände aus. Es besteht aus Choanocyten (Kragengeißelzellen), deren Geißeln ständig einen unidirektionalen Wasserstrom erzeugen (Abb. 1.1). Tiere mit einem Körpervolumen von 500 ml filtern so 2 l Wasser pro Minute. Dabei nehmen Archaeocyten oder Choanocyten mittels Phago- und Pinocytose die eingestrudelte Nahrung (Mikroorganismen und Detritus) auf. Ausgeleitet wird der Wasserstrom durch größere Öffnungen, die Oscula (Storch & Welsch 1997). Porocyten, kontraktile Zellen, welche um die Poren herum angeordnet sind, scheiden Kollagen sowie Polysaccharide ab und befestigen das Tier am Substrat. Zwischen Choanoderm und Pinacoderm liegt das Mesohyl, das bei vielen Arten die Hauptmasse des Schwammkörpers einnimmt. Seine Grundsubstanz bilden Glykoproteine und Kollagenfasern. Dazwischen sorgen Schwammnadeln

(Spicula, Skleren, Skleriten) aus Calcit (CaCO_3) oder Siliciumdioxid (SiO_2) und bei Kiesel-schwämmen ein zusätzliches Spongengerüst für Stabilität (Storch & Welsch 1997).

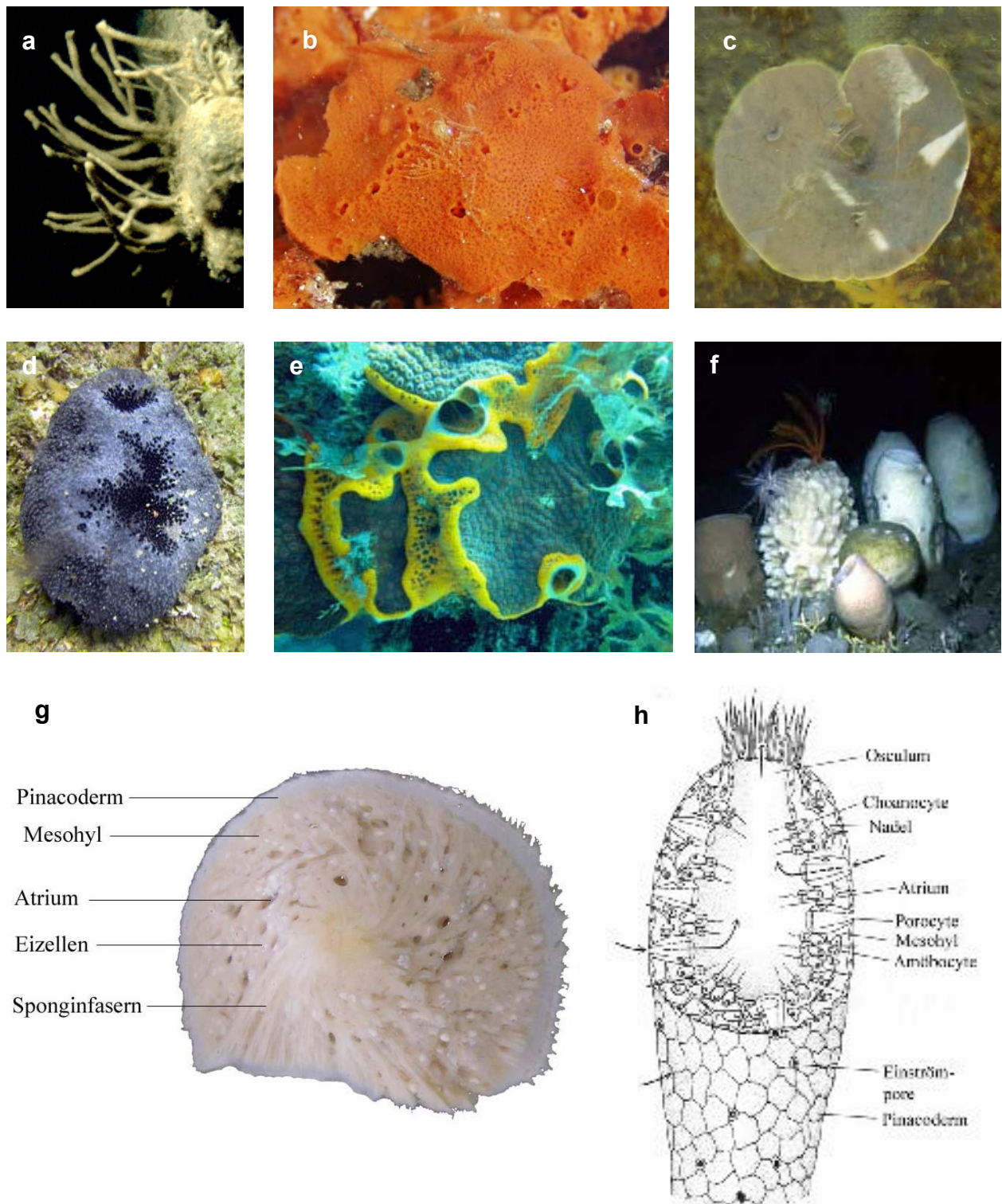


Abbildung 1.1: Wuchsform und Morphologie von Schwämmen unterschiedlicher Habitate. (a) *Spongilla lacustris* (Süßwasser, Foto: H. Maag), (b) *Esperiopsis fucorum* und (c) *Phakellia ventilabrum* (Nordsee), (d) *Spheciospongia vesparium* und (e) *Mycale laevis* (Karibik), (f) Tiefseearten (Antarktis, Foto: J. Gutt). Aufbau eines Schwammkörpers am Beispiel von (g) *Tetilla zetlandica* (Demospongiae) und (h) schematisch (Calcarea, Quelle: Westheide & Rieger 1996).

Schwämme sind getrenntgeschlechtlich oder zwittrig und können sich geschlechtlich oder ungeschlechtlich vermehren. Bei der sexuellen Fortpflanzung werden die aus Choanocyten entstehenden Spermatogonien ins Wasser abgegeben und von benachbarten Artgenossen eingestrudelt. Im Schwammkörper findet die Befruchtung der aus Choanocyten oder Archaeocyten gebildeten Oocyten statt. Später werden Planktonlarven (Coeloblastula, Amphiblastula, Parenchymula) entlassen, die sich nach Auffinden eines geeigneten Substrates festheften und mit der Metamorphose beginnen (Ax 1995). Asexuelle Fortpflanzung kann durch Fragmentierung erfolgen. Dabei schnüren die Schwämme an ihrer Außenseite fast vollständige Jungtiere ab, die sich nach kurzem Aufenthalt im Plankton auf Hartsubstrat festsetzen.

Viele Schwammarten gemäßigter Breiten zeigen einen jahreszeitlich geprägten Lebenszyklus. Sie verbringen den Winter als Dauerstadien ohne funktionsfähiges Wasserkanalsystem oder bilden spezielle Dauerknospen, die sogenannten Gemmulae (Abb. 1.2). Dabei stirbt der Körper bei Süßwasserschwämmen und einigen marinen Arten bis auf kapselförmige, ungefähr 1 mm große, von Spongin umhüllte Ansammlungen aus Thesocyten ab. Unter günstigen Umweltbedingungen wachsen diese zu einem vollständigen Tier aus (van Soest 1996). Schwämme verfügen demnach über eine hohe Regenerationsfähigkeit. Auch Wachstum und Alter sind sehr variabel. Laut Ruppert & Barnes (1994) reicht die Spanne von einjährigen Schwämmen (Calcarea kaltgemäßigter Gewässer) bis zu 500-jährigen Formen (Tiefseeschwämme). Das Alter antarktischer Riesenschwämme wurde sogar auf über 1000 Jahre geschätzt (Gatti 2002).

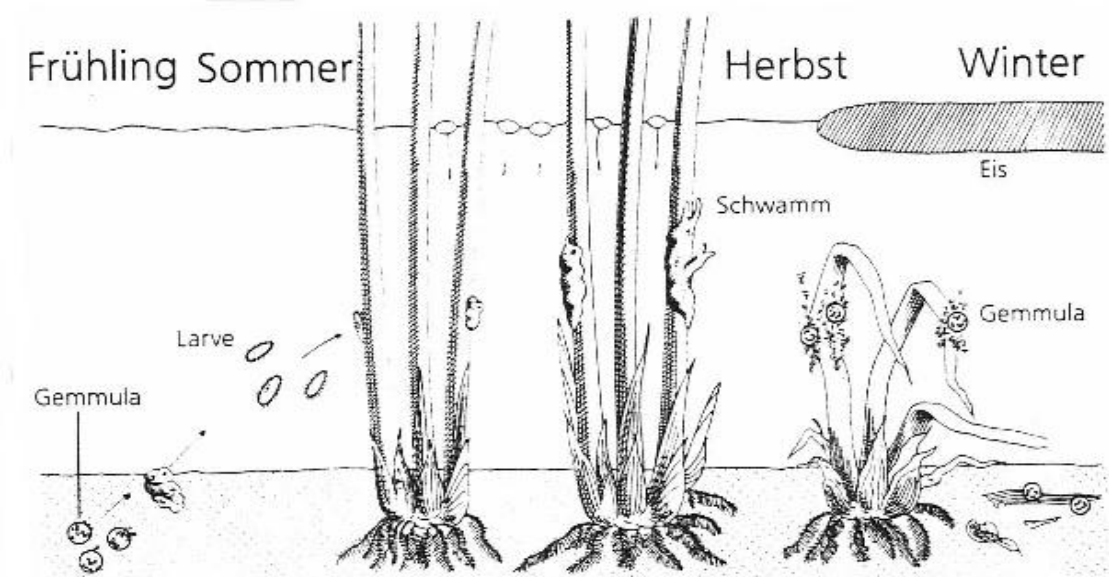


Abbildung 1.2: Lebenszyklus eines Schwammes gemäßigter Breiten am Beispiel einer Süßwasserart (Quelle: Westheide & Rieger 1996).

1.1.2 Taxonomie

Die 7000 heute beschriebenen Schwammarten repräsentieren nur einen kleinen Teil des Artenspektrums, das jemals existierte (Hooper & van Soest 2002). Schwämme haben seit dem späten Kambrium mit nahezu unverändertem Körperbau überlebt. Bezogen auf die rezente Artenzahl und die Beständigkeit der Morphologie zählen Schwämme zu einer der erfolgreichsten Gruppen unter den aquatischen Invertebraten. Ihnen kam schon immer eine wichtige Rolle im marinen Ökosystem zu (Storch & Welsch 1997). Im Jura waren weltweit Kieselschwämme am Aufbau von Riffen beteiligt und somit aus heutiger Sicht gesteinsbildend (z.B. Schwäbische Alb). Die taxonomische Klassifizierung unterscheidet vier Teiltaxa. Neben den rein fossilen Archaeocyatha werden die Schwämme anhand der Nadeltypen den drei rezenten Gruppen Hexactinellida, Demospongiae und Calcarea (Abb. 1.3) zugeordnet (Hooper & van Soest 2002).

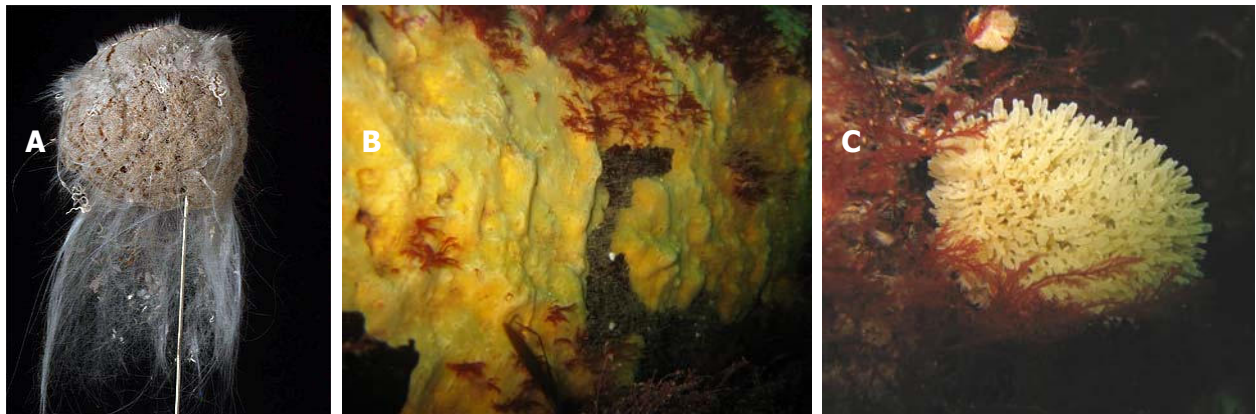


Abbildung 1.3: Vertreter der rezenten Schwammtaxa: (a) *Pheronema carpenaria* (Hexactinellida, Foto: Senckenberg/Frankfurt), (b) *Halichondria panicea* (Demospongiae, Foto: U. Schilling), (c) *Leucosolenia complicata* (Calcarea, Foto: U. Schilling).

Die Hexactinellida (Glasschwämme) sind durch eine syncytiale Organisation, das Fehlen von Pinacocyten und den Besitz sechsstrahliger Kieselsäuresklerite gekennzeichnet (Abb. 1.4b). Größere Populationen findet man in der Antarktis oder in tieferen Meeresbereichen (Storch & Welsch 1997). Ebenso wie die Hexactinellida besitzen auch die Demospongiae (Kieselschwämme) Sklerocyten, die intrazellulär um einen Achsenfaden aus Skleroprotein Nadeln aus Kieselsäure (SiO_2) abscheiden. Eine Nadel wird stets von einem einzigen Skleroblasten produziert. So entsteht ein Skelett aus Mega- und Mikroskleren (Abb. 1.4a). Das Vorkommen von Spongioblasten, die im Mesohyl das Skleroprotein Spongin ausscheiden, grenzt die Kieselschwämme von den anderen Schwammtaxa ab. Zu den Demospongiae zählen 95% der rezenten Schwammarten. Dieser Gruppe gehören auch die Süßwasserschwämme an (Ax 1995; Storch & Welsch 1997). Die Calcarea (Kalkschwämme) bilden ein kleines, vorwiegend im marinen Flachwasser heimisches Taxon. Sie besitzen Kalknadeln, welche extrazellulär (ohne

Axialfilament) von Sklerocyten sekretiert werden und meist isoliert im Gewebe liegen (Storch & Welsch 1997). An der Bildung der aus kristallinem Calciumcarbonat (CaCO_3) mit geringen Anteilen von Magnesiumcarbonat (MgCO_3) bestehenden Nadeln sind mehrere Zellen beteiligt (Ax 1995). Es besteht keine Trennung in Mikro- und Megaskleren (Abb. 1.4c).

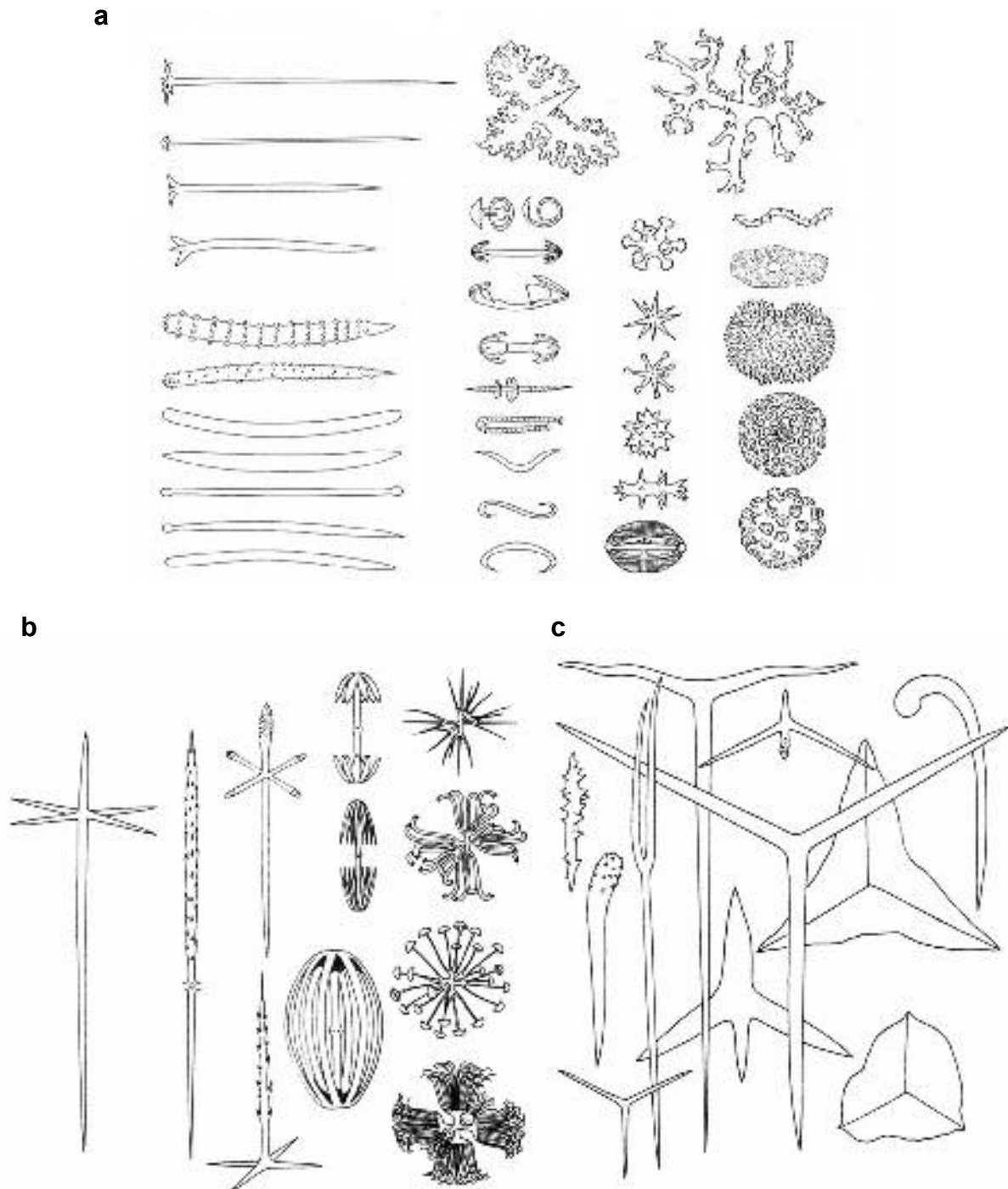


Abbildung 1.4: Spicula-Grundtypen der rezenten Schwammtaxa: Mega- und Mikroskleren der (a) Demospongiae und (b) Hexactinellida (Kieselnadeln). Megaskleren (Kalknadeln) der (c) Calcarea (Quelle: Westheide & Rieger 1996).

1.2 Schwammökologie

1.2.1 Lebensraum Orkney- und Shetland-Inseln (Nordsee)

Schwämme zählen zu den häufigsten Organismen auf den Hartsubstratflächen der Nordsee. Die Schwammfauna wird von den Demospongiae dominiert, aber auch einzelne Vertreter der Calcarea sind häufig (van Soest et al. 2000). Im Gebiet der Orkney- und Shetland-Inseln sind insgesamt 36 Arten beschrieben (siehe Tabelle in Abb. 1.5).

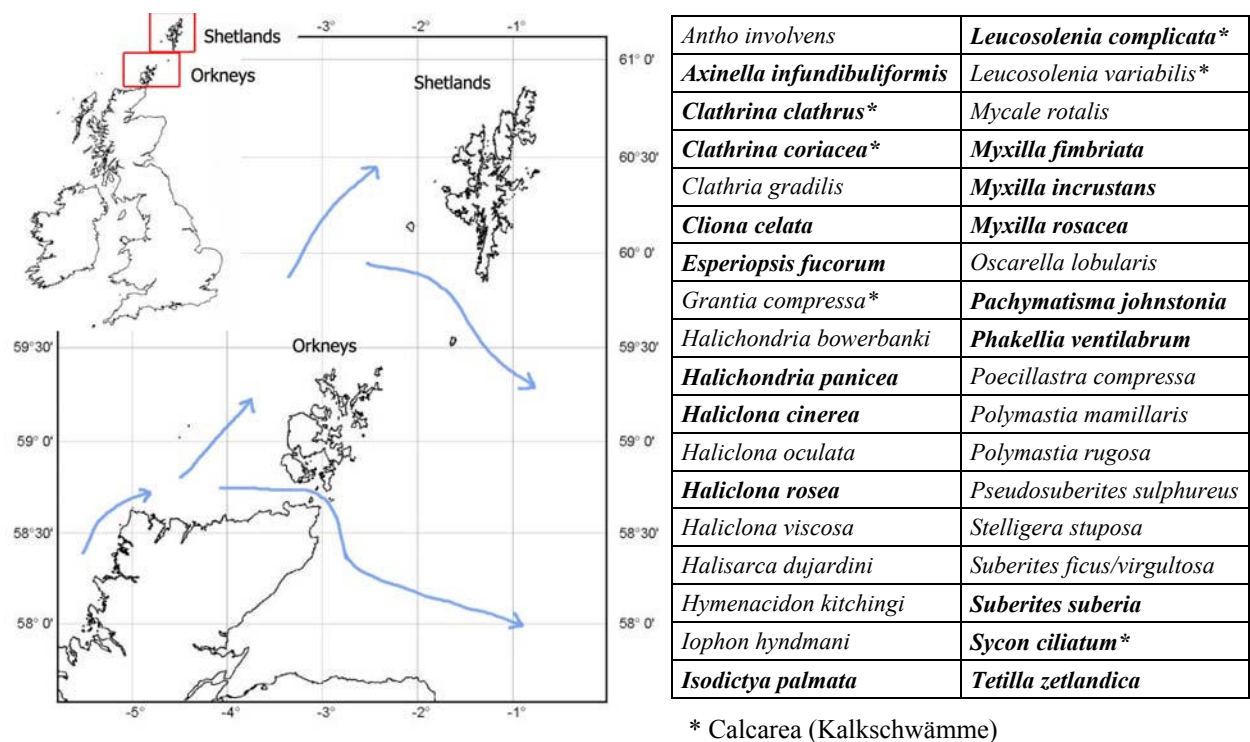


Abbildung 1.5: Lage der Probennahmegebiete und oberflächliche Meeresströmungen (blau) sowie im Gebiet der Orkney- und Shetland-Inseln vorkommende Schwammarten. In der vorliegenden Arbeit untersuchte Arten in Fettdruck (Quellen: Hiscock 1998; van Soest et al. 2000).

Die vor der Nordostspitze Schottlands liegenden Orkney-Inseln bestehen hauptsächlich aus Sandstein. Lediglich an der Westküste der Hauptinsel (Mainland) sind noch Felsen vulkanischen Ursprungs zu sehen (Abb. 1.6a). Die insgesamt 70 Inseln (18 sind bewohnt) lagern auf einem engen Schelf, der schnell in die Tiefe abfällt (54-73 m). Die Fjorde und Sunde erreichen kaum eine Tiefe von 36 m. Die gesamte Küstenlinie der Inseln umfasst eine Länge von nahezu 900 km und besteht zu 89% aus Hartsubstrat. Die Lufttemperatur liegt im Winter bei durchschnittlich $-4,5^{\circ}\text{C}$, im Sommer wird es bis zu 20°C warm. Die Niederschlagsmenge beträgt ca. 90-100 cm/Jahr, die Luftfeuchtigkeit ist mit 80-90% immer vergleichsweise hoch. Der Wind weht meist aus West bis Südost (Hiscock 1998). Im Gebiet der Orkney-Inseln treffen Nordsee und Atlantik

aufeinander. Die hydrographischen Bedingungen werden durch die Gezeitenströmungen dieser beiden Wassermassen bestimmt. Dadurch ergeben sich an der Westküste nordwärts gerichtete Strömungen, während das Wasser an der Ostküste nach Süden fließt. Eine starke, westwärts gerichtete Strömung (2 m/s) durch den Pentland Firth komplettiert den im Uhrzeigersinn verlaufenden Wasserstrom. Der Tidenhub liegt zwischen 1-3 m. Die Wassertemperatur, die im Winter und Frühjahr bei ca. 5°C liegt, übersteigt 13°C im Sommer nicht. Der aus Nordost kommende Atlantikstrom sorgt für das Fehlen extremer Temperaturen. Die Salinität beträgt ca. 35‰. Der Sedimenteintrag im Gebiet der Orkneys ist gering, wodurch sich ein niedriger Extinktionsgradient ergibt. Die Lichtstärke nimmt also nur langsam in tiefere Wasserschichten hinunter ab. Da Salinität und Wassertrübung der Küstengewässer nur kleinen saisonalen Fluktuationen unterworfen sind, prägen Tageslichtmenge, Wellen- und Strömungsexposition die Ausbildung der marinen Lebensgemeinschaften. In geschützten Buchten wurden Fischfarmen angelegt (Abb. 1.7a). Obwohl seit 1977 Öl gefördert wird, gilt die Region als relativ unverschmutzt (Hiscock 1998).

Die Shetland-Inseln sind von den Orkneys durch den 121 m tiefen Fair Isle Kanal getrennt. Sie umfassen eine vorwiegend felsige, durch hohe Klippen, Höhlen und lange Buchten geprägte, 1450 km lange Küstenlinie (Abb. 1.6b). Die hydrographischen Daten entsprechen weitgehend den für die Orkneys beschriebenen. Entlang der Ostseite der Inseln erstreckt sich, teilweise nur 3 km von der Küste entfernt, eine Zone von 80 m Wassertiefe.

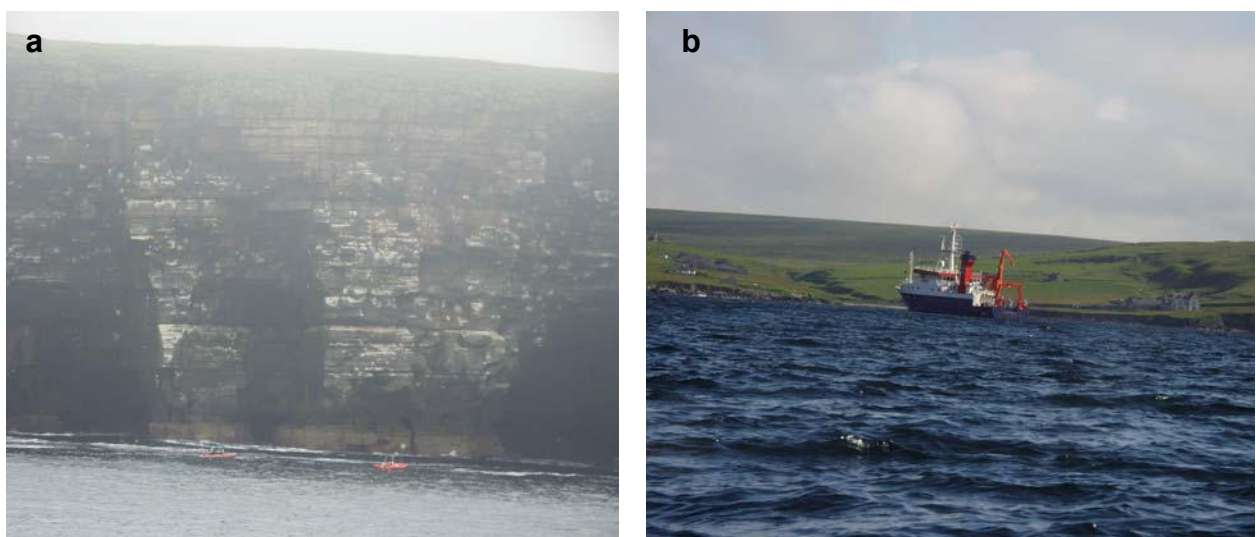


Abbildung 1.6: (a) Taucheinsatz vor der Insel Westray an der Nordwestspitze der Orkneys (exponierte Lage), (b) Forschungsschiff Heincke vor den Shetland-Inseln (geschützte Lage).

Die nachfolgenden Abschnitte sollen einen Einblick in die Habitatstruktur der Probennahmegebiete geben, und dadurch die dort herrschenden ökologischen Bedingungen verdeutlichen. Die untersuchten Schwämme stammen aus zwei sehr unterschiedlichen Lebensräumen. Der Großteil der Arten wurde tauchend im Infralitoral auf Hartsubstrat an der Westseite der Orkney-Inseln gesammelt (vgl. Kapitel 1.2.1.1 bis 1.2.1.3). Außerdem fanden Probennahmen mit der Dredge in weniger exponierten, zirkalitoralen Bereichen bei ca. 100 m Wassertiefe an der Ostseite der Shetland-Inseln statt (vgl. Kapitel 1.2.1.4).

1.2.1.1 Tuquoy Bay (Westray, 59° 15. 988 N; 02° 07. 440 W)

In dieser, mit 10 m Tiefe ziemlich flachen, geschützt liegenden Bucht (Abb. 1.7a) sind Wellenschlag und Gezeitenströmung nur schwach ausgeprägt. Der mit ca. 30 cm hohen Absätzen gestufte Felsgrund wird durch Flächen aus rauem Sand und Maerlschill (*Phymatholiton calcareum*) unterbrochen (Abb. 1.7b). Dieser Weichboden beherbergt sabellide Polychaeta, Holothuria sowie Anthozoa und Bivalvia (z.B. *Ensis* sp., *Pecten maximus*). Auf dem Hartsubstrat steht ein dichter Laminarienwald (*Laminaria hyperborea*) mit reichhaltiger Epiphytengemeinschaft (Abb. 1.7c) sowie Rotalgenunterwuchs. Auf den Laminarienphylloiden (Blättern) tummeln sich Gastropoden (v.a. *Helcion pellucidum*, *Calliostoma zizyphinum*), während die Cauloide (Stängel) oft dicht mit Rotalgen, kolonialen und solitären Asciden sowie Schwämmen (*Halichondria panicea*, *Haliclona* sp.) bewachsen sind. *Leucosolenia complicata* und *Sycon ciliatum* hängen zum Teil dicht an den auf den Laminarien wachsenden Rotalgen. Zwischen den Laminarienrhizoiden (Wurzelkrallen) findet man *Haliclona* sp., *Didemnum* sp. und verschiedene Crustaceen (*Galathea* sp., *Liocarcinus puber*) (eigene Beobachtung).



Abbildung 1.7: (a) Überblick über die Tuquoy-Bay (Fischfarm in der Bildmitte), (b) Maerlschillfläche mit leerer Muschelschale und (c) mit Algen, Ascidiacea und Porifera bewachsener Laminarienstängel.

1.2.1.2 Saviskaill Bay (Rousay, 59° 11. 582 N; 03° 02. 823 W)

Dieses maximal 25 m tiefe Gebiet ist nur geringer Wellenexposition ausgesetzt und wird von einem mäßigen Gezeitenstrom durchspült. Der zunächst ebene, mit einem gemischten Laminarienwald (Abb. 1.8a) und zahlreichen Rotalgen, Ascidien und Schwämmen bewachsene Felsgrund geht unterhalb von 12 m in Felswände (Abb. 1.8b) und Canyons über. Das Hartsubstrat wird durch Sand- und Schillflächen (Abb. 1.8c) bzw. Ansammlungen von Krustenrotalgen unterbrochen. Auf den Felsen in größerer Tiefe sind *Cliona celata*, *Ascidia mentula*, *Liocarcinus* sp., *Pachymatisma johnstonia*, *Alcyonium digitatum* und *Bugula* sp. häufig (eigene Beobachtung).

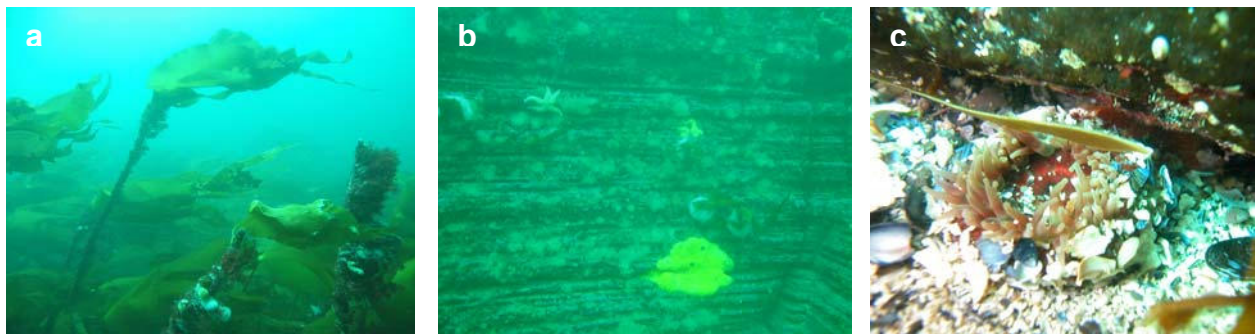


Abbildung 1.8: (a) Laminarien in der Strömung, (b) von Invertebraten besiedelte Felswand, (c) Anthozoa (Seerose) im Muschelschill.

1.2.1.3 Red Nev (Westray, 59° 17. 647 N; 03° 01. 416 W)

Die an der Westküste liegenden hohen Felsklippen fallen steil bis in größere Tiefen (30 m) ins Meer ab. Sie sind starker Wellenexposition und Gezeitenströmung ausgesetzt (Abb. 1.9a). Felsterrassen mit vertikalen und horizontalen Flächen sowie Höhlen kennzeichnen dieses Gebiet. An der Hochwasserlinie siedeln Napfschnecken (*Patella* sp.) und Seepocken (*Balanus* sp., *Semibalanus* sp.) auf dem Fels. Darunter beginnt die Besiedlung mit Braunalgen (*Allaria esculenta*, *Laminaria* sp.). Die Felsterrassen sind je nach ihrer Lage unterschiedlich bewachsen (Abb. 1.9b, c). Horizontale Flächen sind mit Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) oder dichten Schwammteppichen überzogen. Auf vertikalen Flächen wird die Lebensgemeinschaft von *Dendrodoa grossularia* dominiert. Stellen ohne diese Ascidien zeichnen sich durch eine dichte Ansammlung von Schwämmen (z.B. *Halichondria panicea*, *Myxilla* sp., *Esperiopsis fucorum*, *Halisarca dujardini*) aus. Dazwischen tummeln sich kleinere Crustacea (z.B. *Caprella* sp.). In Felsritzen und Spalten sitzen Ophiuroidea (z.B. *Ophiotrix* sp.) und Hydrozoa (z.B. *Corynactis* sp., Abb. 1.9c). Ebenfalls abundant sind die Seesterne *Henricia sanguinolenta*, *Asterias rubens* und *Luidia sarsi*. In größerer Tiefe werden die Felsnischen von den Schwämmen *Cliona celata*

und *Pachymatisma johnstonia* sowie verschiedenen Ascidien (*Ascidiella* sp.), Schlangensteinen, kleineren (*Galathea* sp.) und größeren Krebsen (*Hommarus gammarus*, *Liocarcinus puber*) bewohnt (eigene Beobachtung).



Abbildung 1.9: (a) *Patella* sp. und Seepocken an der Niedrigwasserlinie, (b) mit Schwämmen bewachsene Felsterrasse im Sublitoral, (c) Schlangenstein (Ophiuroiden) in einer Felsnische.

1.2.1.4 Ostküste der Shetland-Inseln

In den beprobten Tiefwasserhabitaten kann die Gezeitenströmung schwach oder stark ausgeprägt sein. Wellenexposition spielt hier keine Rolle. In einer Tiefe von 80-100 m findet man vorwiegend ein gemischtes Substrat aus Weichboden, Kies, einzelnen Steinen und Muschelschalen vor. Im Sediment siedelt eine reiche Fauna an Mollusca (z.B. *Glycymeris glycymeris*, *Aphorrais* sp.), Crinoidea (Seefedern) und anderen Echinodermata (Abb. 1.10a). Auch die in Symbiose mit dem Schwamm *Suberites suberia* oder der Seeanemone *Adamsia carciniopados* lebenden Einsiedlerkrebse *Pagurus bernhardus* und *P. prideaux* fanden sich in der Dredgeprobe. Charakteristisch für dieses Habitat (Abb. 1.10b) sind jedoch die dominanten Schwammarten *Phakellia ventilabrum*, *Axinella infundibuliformis* und *Stelligera stuposa* (Connor et al. 1997).

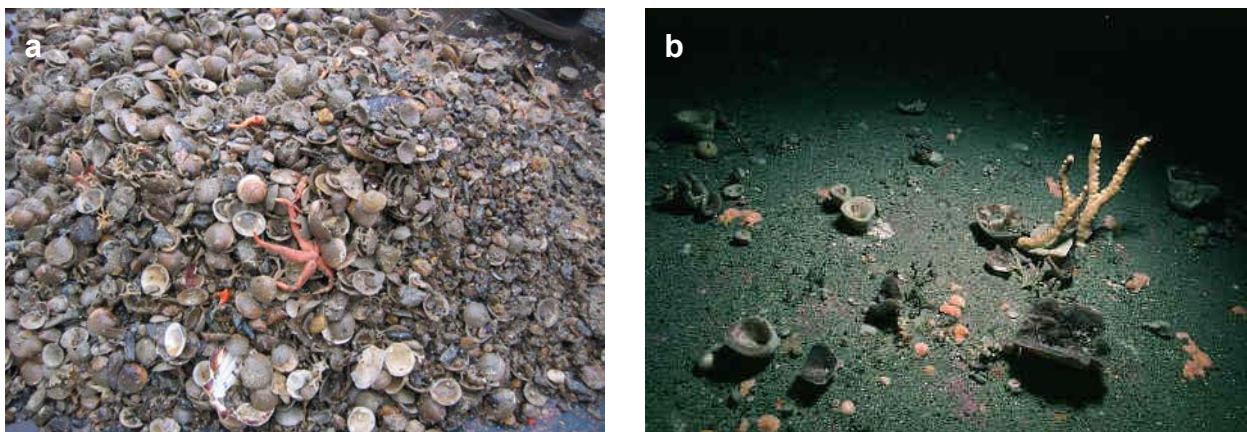


Abbildung 1.10: (a) Zusammensetzung der Dredgeprobe und (b) Habitatstruktur (Foto: www.itsligo.ie).

1.2.2 Lebensgemeinschaften und assoziierte Organismen

Die küstennahen Felshabitate der Orkney- und Shetland-Inseln sind größtenteils von deutlicher Wellenbewegung und starker Gezeitenströmung geprägt. In den ausgedehnten, lichtdurchfluteten Flachwassergebieten der West- und Südküsten bilden Braunalgen (*Laminaria hyperborea*, *L. digitata*) und Rotalgen (*Plocamium cartilagineum*, *Delesseria sanguinea*, *Ceramium* sp.) dichte Wälder, die bis in ca. 20 m Tiefe hinabreichen (Abb. 1.11a). Zwischen den Inseln findet man sehr ruhige, geschützte Habitate (Hiscock 1998).

Die meterlangen Laminarienstängel stehen aufrecht in der Strömung und sind, abhängig von der Jahreszeit, teilweise oder vollständig mit Porifera (*Leucosolenia complicata*, *Sycon ciliatum*, *Halichondria panicea*, *Haliclona* sp.), Ascidiacea (*Ascidiella* sp., *Didemnum* sp.), Bryozoa (*Bugula* sp., *Alcyonidium* sp.) und Rhodophyceae (*Plumaria* sp., *Ceramium* sp.) bewachsen (Abb. 1.11a). Im tiefer gelegenen Sublitoral dominieren aufgrund der starken Gezeitenströmung und des Lichtmangels tierische Organismen (Abb. 1.11b) (eigene Beobachtung und de Kluijver 1993). Diese Habitate bieten geeignete Siedlungsflächen für eine reichhaltige Fauna sessiler, filtrierender Organismen. Abhängig von der Substratstruktur ist ein unterschiedliches Artenspektrum an Hydrozoa, Bivalvia, Bryozoa, Tunicata und Porifera zu beobachten. Felsterrassen werden teilweise vollständig von krustenbildenden Schwammarten (*Myxilla* sp., *Esperiopsis fucorum*, *Haliclona* sp.) oder dichten Muschelbänken (*Modiolus modiolus*, *Mytilus edulis*) überzogen. Gemeinsam mit einer Vielzahl von Ascidien (*Dendrodoa grossularia*, *Ascidia* sp., *Clavelina* sp.) und Hydrozoen (*Corynactis* sp., *Anemonia* sp., *Sagartia* sp., *Urticina* sp.) besiedeln Schwammarten wie *Halichondria panicea*, *Pachymatisma johnstonia*, *Cliona celata* oder *Clathrina* sp. vertikale Felswände, Felsspalten und -nischen.



Abbildung 1.11: (a) Blick in den unteren Bereich eines Laminarienwaldes (Tuquoy Bay), (b) ein mit Invertebraten besiedeltes, tierdominiertes Habitat (Foto: U. Schilling).

Wie die Beschreibung der Lebensgemeinschaften bereits andeutet, interagieren die im Gebiet der Orkneys und Shetlands heimischen Schwammarten mit dem gesamten Spektrum der benthischen Organismen (eigene Beobachtungen und de Kluijver 1993; Hiscock 1998; van Soest et al. 2000). Die Schwämme nutzen andere Organismen wie Algen und Mollusken als Siedlungsfläche. *Suberites ficus* wächst z.B. auf den Schalen der Muschel *Chlamys opercularis* (Bloom 1975), während *Suberites suberia* bevorzugt von Einsiedlerkrebsen bewohnte Schneckenschalen besiedelt. Sie selbst müssen sich gegen die schädlichen Einflüsse von Weidegängern (Echinoidea, Asteroidea, Prosobranchia) und Räubern (Asteroidea, Opisthobranchia) behaupten. Sowohl einige Nacktschnecken als auch Seesterne haben sich auf den Fraß von Schwämmen spezialisiert. *Archidoris pseudoargus* bevorzugt *Halichondria panicea* (Picton 1994), während sich *Henricia sanguinolenta* von *Isodictya* sp. ernährt (Sheild & Witman 1993). Fische, die dominierenden Schwammprädatoren in wärmeren Gewässern wie der Karibik und im Mittelmeer, spielen dagegen in der Nordsee keine Rolle. Des Weiteren stehen Schwämme mit anderen sessilen Filtrierern (Hydrozoa, Ascidiacea, Bryozoa) und Algen in Konkurrenz um die besten Siedlungsflächen.

Aufgrund ihrer Körpergestalt (eine große mit vielen Poren und Kanälen durchzogene Oberfläche) und ihrer Lebensweise (konstantes Pumpen von großen Wassermengen durch den Körper) bieten Schwämme ein geeignetes Substrat für eine Vielzahl an Makro- und Mikroorganismen (Klitgaard 1995; Würtz 1999; Hentschel 2003). Müller (1993) vermutet eine Festigung der Symbiose zwischen Schwämmen und Mikroorganismen durch Sekundärmetaboliten von geringem Molekulargewicht, die cytostatische und antivirale Aktivität besitzen, und somit das Eindringen von fremden Mikroorganismen verhindern oder eingedrungene Mikroorganismen töten. Die Bildung von Makromolekülen (Lectinen) soll nützliche Bakterien anziehen und zur Ansiedlung im Mesohyl oder intrazellulär in Vakuolen anregen.

1.2.3 Chemische Ökologie

Im Allgemeinen ist die Produktion von Sekundärmetaboliten eng an eine sessile Lebensweise und langsames Wachstum gekoppelt (Uriz et al. 1992). Wo morphologische Abwehrstrukturen (festes Außenskelett) weitgehend fehlen, scheint die Evolution die Ausbildung einer chemischen Verteidigung begünstigt zu haben. Substanzen zum Schutz vor Räubern, Weidegängern oder Konkurrenten wurden bei vielen Pflanzen und Tieren nachgewiesen. Abgesehen davon, stellt für alle marinen, filtrierenden Invertebraten das Infektionsrisiko durch Mikroorganismen und die Besiedelung mit anderen Organismen einen Risikofaktor dar. Aufgrund ihres Körperbaus sind

besonders die Schwämme gefordert, schädliche Einflüsse von *Fouling*- und Mikroorganismen zu minimieren. Zahlreiche Studien belegen die allelopathische, antilarvale, antiprädatorische, antimikrobielle, enzyminhibitorische und cytotoxische Wirkung von Schwammmetaboliten (Burns et al. 2003). Forschungsarbeiten in diesem Bereich beschränkten sich bisher vor allem auf die karibische (z.B. Pawlik 1993; Pawlik et al. 1995, 2003), mediterrane (z.B. Amade et al. 1987; Martin & Uriz 1993; Uriz et al. 1991, 1992, 1996) und antarktische Schwammfauna (McClintock 1987; McClintock et al. 1994; Furrow 2003). Besonders gut untersucht ist die Fraßabwehr (Faulkner & Gishelin 1983; van Alstyne & Paul 1992; Schupp et al. 1999). Anfänglich wurden ichthyotoxische Effekte im Labor zumeist an Goldfischen untersucht. Diese Experimente lassen jedoch keine Aussagen zur ökologischen Wirkung der untersuchten Substanzen zu. Heute hat sich daher ein Test zur Fraßabschreckung etabliert, bei dem Schwammextrakte einem künstlichen Futter beigemischt und als Pellets sowohl im Freiland als auch im Labor karibischen Fischen angeboten werden (Green 1977; Bakus 1981; Coll et al. 1982; Assmann et al. 2000). Studien mit räuberischen Invertebraten hingegen sind selten (Waddel & Pawlik 2000; Lippert 2003). Während sich zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung von Naturstoffen der Hemmhofstest als Standardmethode etablierte, gibt es zur Erforschung der Bewuchshemmung (*Antifouling*) kein einheitliches Testverfahren. Freilandexperimente sind auf diesem Gebiet eher die Ausnahme (Henrikson & Pawlik 1995; Dobretsov & Wahl 2001; Wahl 2001). Vielmehr führte die Beobachtung von toxischen Effekten gegenüber Larven zu der Annahme, dass aus Schwämmen isolierte Naturstoffe eine *Antifouling*-Wirkung besitzen. Am seltensten untersucht wurde bisher die UV-Schutzwirkung von Schwammmetaboliten.

Während die Wirkung vieler Sekundärmetabolite bekannt ist, kann über ihre ökologische Funktion meist nur spekuliert werden. Die bisher durchgeführten Biotests sind vor allem auf die Erforschung der generellen biologischen Aktivität oder der pharmakologischen Nutzbarkeit der Naturstoffe ausgelegt. Ökologische Zusammenhänge werden selten berücksichtigt. Dabei scheinen die biologisch aktiven Substanzen in komplexen Abwehrmechanismen zu interagieren. Seit bekannt ist, dass mikrobielle Biofilme bei der Ansiedlung von Invertebratenlarven eine wichtige Rolle spielen, kann man annehmen, dass eine antibiotische Wirkung auch mit der Besiedlungshemmung in Verbindung steht. Die Frage, welche Kriterien erfüllt werden müssen, um Biotests mit ökologischer Aussagekraft durchzuführen, gibt immer wieder Anlass zu Diskussionen. Neben der Auswahl der Methodik, welche möglichst die natürlichen Bedingungen berücksichtigen sollte, ist auch der Einsatz der Konzentration der Testsubstanz bzw. deren Extraktionsweise zu beachten (Pawlik & Chanas 1995).

1.2.4 Bedeutung für den Menschen

Neben ihrer elementaren Rolle in der marinen Ökologie sind Schwämme auch kommerziell von Bedeutung. Seit Jahrtausenden wird *Euspongia officinalis* wegen seiner Nadellosigkeit und großen Oberfläche, die das fünfzigfache seines Gewichts an Wasser aufnehmen kann, als Badeschwamm geschätzt. *Hippospongia communis* hingegen findet in der Industrie, zum Schleifen und Polieren, Verwendung. Über die Hälfte des Weltjahresertrages an Schwämmen entfällt auf Tunesien, wo vor allem die beiden oben genannten Arten angelandet werden.

Wegen ihres immensen Potentials zur Produktion biologisch aktiver Wirkstoffe (Fenical 1997) sind Schwämme als Ressourcen für die pharmazeutische Industrie interessant. Bereits Anfang der 1950er Jahre wurde das Nucleosid-Analogon Ara-A isoliert, welches z.B. die Vermehrung von Herpesviren hemmt. Heute sind Ara-A und Ara-C aus *Cryptothethya crypta* sowie die aus *Luffariella variabilis* gewonnenen Manoalide (Entzündungshemmer) als Medikamente verfügbar (Pomponi 2000). Neben den bereits kommerziell erhältlichen Substanzen werden zur Zeit unter anderem Agelasphin-Analoga (*Agelas mauritanus*, Chemotherapie), Halichondrin B (*Halichondria okada* und *Lissodendorynx* sp., Krebstherapie) und Naturstoffe aus *Petrosia contignata* (Asthma-Wirkstoffe) klinisch erprobt (Proksch 2001). Weitere biologisch aktive Schwammnaturstoffe sind in Kap. 1.3.2 beschrieben.

Da der Einsatz des umweltschädlichen Tributylzinn (TBT) gegen unerwünschten Aufwuchs auf Schiffen in den nächsten Jahren verboten werden soll, gewinnen Schwämme immer größere Bedeutung bei der Suche nach *Antifouling*-Substanzen. In *Acanthella*-, *Aplysilla*-, *Dysidea*- und *Lyssodendorynx*-Arten wurden bereits Terpene gefunden, die durch die Unterbrechung der Metamorphose eine dauerhafte Ansiedlung sessiler Invertebraten verhindern. Wenn es gelingt, diese Wirkung nutzbar zu machen, könnten die durch *Biofouling* verursachten, wirtschaftlichen Schäden für die Schifffahrt minimiert werden (TSH Schleswig-Holstein 2003).

Die Möglichkeit, dass assoziierte Mikroorganismen für die Produktion der industriell nutzbaren Metaboliten verantwortlich sein könnten, hat das kommerzielle Interesse an Schwämmen gesteigert. Momentan fehlen jedoch geeignete Methoden für die nachhaltige und umweltverträgliche Produktion von Schwammbiomasse. Daher konzentrieren sich Forschungsvorhaben neben der Naturstoffisolierung auch auf die Entwicklung von Marikulturen, die Nutzung von schwammassoziierten Mikroorganismen als Wirkstoffproduzenten und die Synthese bioaktiver Substanzen (Osinga et al. 1999, 2001).

1.3 Schwammchemie

Schwämme waren die ersten marinen Invertebraten, welche auf der Suche nach Naturstoffen untersucht wurden (Bergquist 1978). Lange bevor Biologen damit begannen, die ökologische Funktion der isolierten Metaboliten zu studieren, entdeckten Chemiker die Schwämme als reichhaltige Quelle für unbekannte Substanzen und neue, ungewöhnliche Biosynthesewege. Aus Schwämmen wurden bisher doppelt so viele Naturstoffe isoliert wie aus Algen und Cnidaria, fünfmal mehr als aus Mollusca und Echinodermata und sieben mal mehr als aus Ascidiacea (Garson 1994; Baker 1996; Blunt & Munro 1998).

1.1.3 Naturstoffe aus Schwämmen

Nahezu 50% der aus marinen Invertebraten isolierten Naturstoffe stammen aus Schwämmen. Die Anzahl der entdeckten Strukturen variiert abhängig von der geographischen Verbreitung und der taxonomischen Klassifizierung (Tab. 1.1). Zur Chemie der Glasschwämme (Hexactinellida) ist wenig bekannt. Aus der Gruppe der Kalkschwämme (Calcarea) wurden bisher nur die Gattungen *Leucetta* und *Clathrina* eingehender untersucht. Bei allen 31 isolierten Verbindungen handelt es sich um Aminosäurederivate. Mit insgesamt 2600 beschriebenen Substanzen stellen die Kieselschwämme (Demospongiae) bisher das metabolitenreichste Taxon dar. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die einzelnen Schwammarten unterschiedlich intensiv studiert wurden. Während zur Naturstoffchemie der in kaltgemäßigten Habitaten verbreiteten Tiere bisher wenig bekannt ist, sind vor allem die Bewohner von Korallenriffen gut erforscht.

Tabelle 1.1: Anzahl der aus Schwämmen isolierten Naturstoffe, eingeteilt nach geographischen Regionen und taxonomischer Klassifizierung (verändert nach van Soest & Braekman 1999).

Geographische Regionen	Anzahl Substanzen	Taxon (Ordnung/Klasse)	Anzahl Substanzen/Arten
Indo-Westpazifik	800	Dictyoceratida	1250/145
Japanische Gewässer	750	Haplosclerida	665/85
Karibische Korallenriffe	600	Halichondrida	650/100
Australien-Südpazifik	600	Poecilosclerida	350/63
Mittelmeer	550	Verongida	240/22
Ostpazifik	250	Lithistida	200/20
Indischer Ozean	150	Astrophorida	200/38
Ostatlantik	150	Hadromerida	185/40
Rotes Meer	150	Calcarea	40/9
Neuseeländische Gewässer	100	Spirophorida	14/5

Um einen Eindruck von der Vielfalt der bekannten Verbindungen zu erhalten, sollen nachfolgend die in Schwämmen verbreiteten Substanzklassen anhand einiger Beispiele erläutert werden (siehe Abb. 1.12 und 1.13). Alle Angaben wurden aus Sarma et al. (1993) und van Soest & Braekman (1999) entnommen. Zu den häufigsten Sekundärmetaboliten der Schwämme zählen Isoprenoide (50%), Aminosäurederivate und Peptide (25%), Acetogeninderivate (22%), bioaktive Fettsäure-, Polyketid- und Sterolderivate sowie Makrolide. Porphyrine und Saponine kommen selten vor. Die Aminosäurechemie der Schwämme scheint im Allgemeinen von der Tyrosin- und Tryptophanbiosynthese abgeleitet zu sein (Sarma et al. 1993). Aus verschiedensten Taxa wurden bromierte Tyrosinderivate (**1**, **2**), aromatische Alkaloide (**3**) und Indole (**4-6**) isoliert, die sich von den oben genannten Aminosäuren ableiten lassen. Neben den bereits genannten aromatischen Alkaloiden sind die Brompyrrolalkaloide der *Agelas*-Arten, die in *Haliclona*-Arten verbreiteten β -Carbolinalkaloide (Manzamin, Haliclonamin) sowie die Imidazolalkaloide (**7**) der Kalkschwammgattung *Leucetta* bekannt. Terpene zählen neben den Steroiden zu den häufigsten Sekundärmetaboliten in marinen Schwämmen und sind vor allem für karibische und pazifische Arten beschrieben (**8**). Sesquiterpene wurden aus *Axinella* sp. und *Halichondria* sp. isoliert (**9**, **10**).

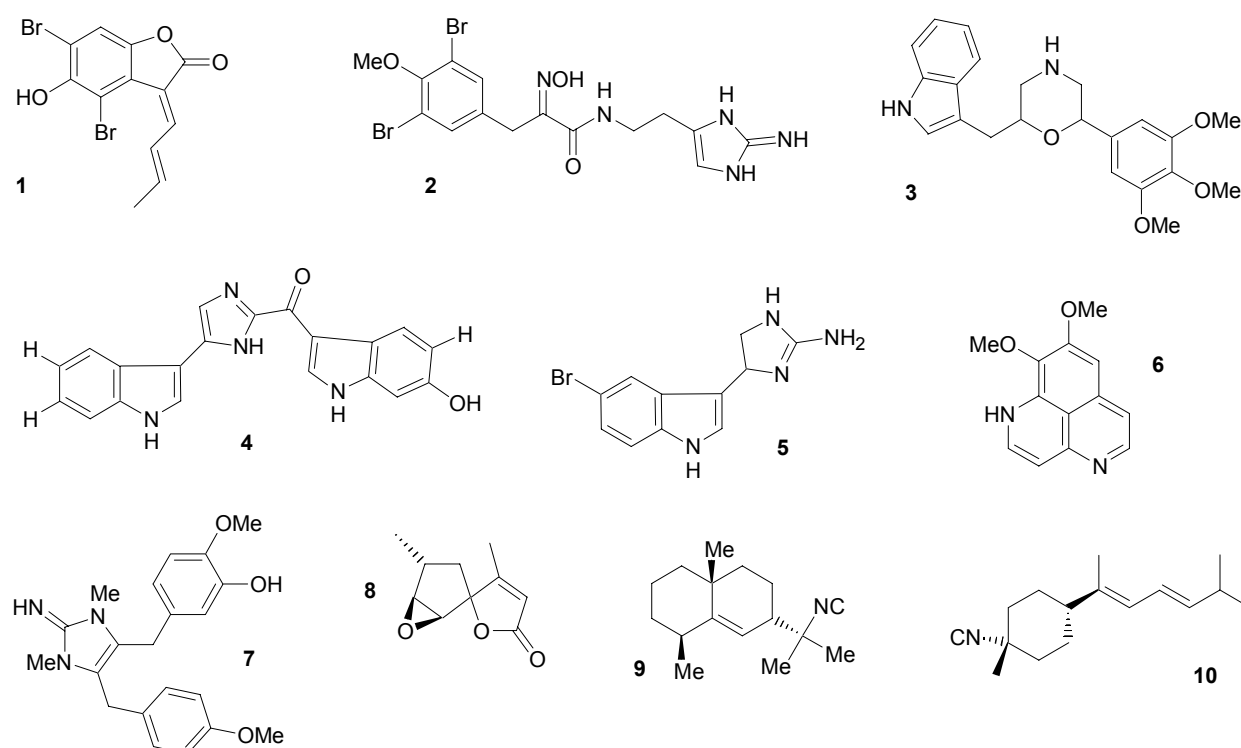


Abbildung 1.12: Sekundärmetaboliten aus Schwämmen. Aplysinadien (**1**), Ianthellin (**2**), Chelonin-A (**3**), Topsentin-B1 (**4**), Discodermindol (**5**), Aaptamin (**6**), Naamin-A (**7**), Adriadyliolid (**8**), stickstoffhaltige Sesquiterpenderivate (**9**, **10**).

Die ubiquitären Fettsäuren und die davon abgeleiteten Lipide sowie Sterole sind meist dem Primärstoffwechsel zuzuordnen. Es wurden jedoch auch ungewöhnlich langkettige, teilweise halogenierte Fettsäuren mit neuen Verzweigungs- und Substitutionsmustern isoliert (**11**). Man vermutet, dass die in Schwämmen nachgewiesenen Carotenoide ursprünglich aus eingestrudelten, autotrophen Organismen stammen und vom Schwamm modifiziert werden. Tropische Schwämme, darunter viele *Dysidea*-Arten, sind eine reichhaltige Quelle für Steroide mit bisher unbekannten modifizierten Seitenketten (**12**). Pyridinderivate finden sich in den karibischen Arten *Niphates* sp. und *Xestospongia* sp. (**13**), aber auch Lactone, Lactame sowie Imidazolderivate (**14**) und Porphyrine (**15**) wurden isoliert. Makrolide (**16**) verschiedenster Substanzklassen sind sowohl unter den Demosponigae als auch Calcarea weit verbreitet. Einige dieser Moleküle sind nahezu identisch mit in Bakterien vorkommenden Stoffen. Auch die in Astrophorida, Hadromerida und Poecilosclerida gefundenen Nucleoside (**17**) könnten mikrobieller Herkunft sein (siehe Abb. 1.13). Die Tatsache, dass aus Schwämmen unterschiedlichster Taxa ähnliche Metaboliten isoliert oder Substanzen mit einzigartiger, für Mikroorganismen typischer Struktur gefunden wurden, führte zu der Annahme, dass mit Schwämmen assoziierte Mikroorganismen als Produzenten der isolierten Naturstoffe in Frage kommen (Kobayashi 1993).

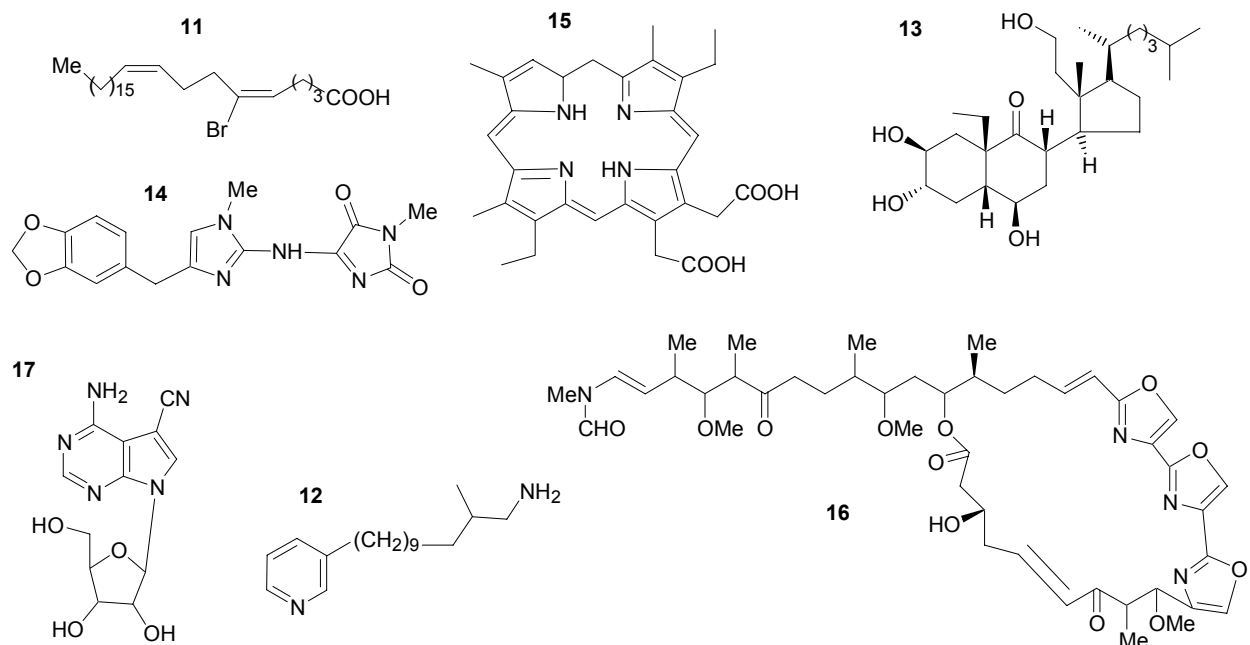
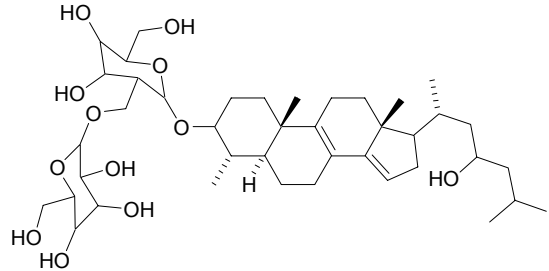


Abbildung 1.13: Sekundärmetaboliten aus Schwämmen. Bromierte Fettsäure (**11**), Herbasterol (**12**), Niphatesin-C (**13**), Clathridin (**14**), Corallistin-A (**15**), Halichondramid (**16**), Toyomycin (**17**).

Nachfolgend sind die, für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Taxa (Fettdruck; hier untersuchte Schwammart in Klammer) charakteristischen Substanzen bzw. Substanzklassen aufgelistet, die laut van Soest & Braekmann (1999) taxonspezifisch sind:

Astrophorida (*Pachymatisma johnstonia*)

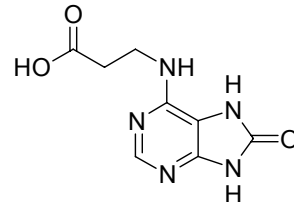
- Saponine
- sulfonierte Sterole
- Bromindol-Metabolite (*Pachymatisma* sp.)
- spezielle Azetidinalkaloide
- Acridinderivate
- Triterpene



Saponin aus *Erylus lendenfeldi* (van Soest & Braekmann 1999).

Poecilosclerida (*Esperiopsis fucorum*, *Myxilla rosacea*, *Myxilla incrustans*, *Myxilla fimbriata*, *Isodictya palmata*)

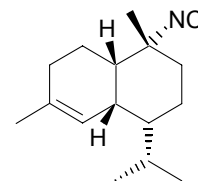
- polycyclische Guanidinalkaloide
- Peroxysesterpenoide
- Triketrin und verwandte Strukturen



Erinacean, ein Purinmetabolit aus dem antarktischen Schwamm *Isodictya erinacea* (Moon et al. 1998).

Halichondrida (*Halichondria panicea*, *Phakellia ventilabrum*, *Axinella infundibuliformis*)

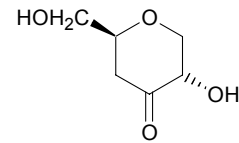
- Pyrrol-2-carbonsäure-Derivate
- Isocyanoterpene
- Sesquiterpene (Curcuphenol)
- Topsentine
- sulfonierte Sterole



Isocyanoterpen aus *Halichondria* sp. (van Soest & Braekmann 1999).

Haplosclerida (*Haliclona cinerea*, *Haliclona rosea*)

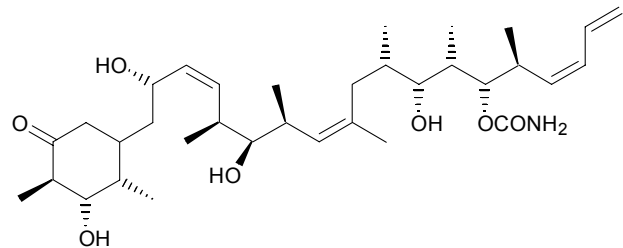
- 3-Alkylpiperidin-Derivate
- Cyclopropen-Sterole
- Tetrahydropyrane
- Sesquiterpene und Diterpenchinone
- Isoquinolinochinone



Haliclonol aus *Haliclona hogarthi*
(van Soest & Braekmann 1999).

Spirophorida (*Tetilla zetlandica*)

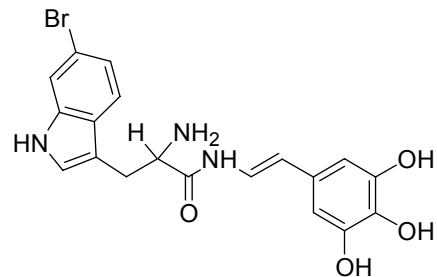
- cyclische Peptide
- Makrolide



Discodermmolid aus *Discodermia dissoluta* (Faulkner 2000).

Hadromerida (*Cliona celata*, *Suberites suberia*)

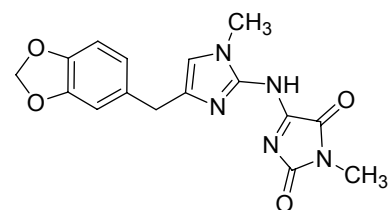
- Aaptamin-Alkaloide
- Pyrroloquinolin-Alkaloide
- Clionamide
- Peroxysesterpenoide
- Peroxypolyketide



Clionamid aus *Cliona celata*
(Andersen & Stonard 1979).

Calcarea (*Clathrina* sp., *Leucosolenia complicata*, *Sycon ciliatum*)

- Guanidin-Imidazole
- langkettige Aminoalkohole



Clathridin aus *Clathrina clathrus*
(van Soest & Braekmann 1999).

1.3.2 Biologisch aktive Metaboliten

Die biologische Aktivität der Schwammnaturstoffe ist genauso vielfältig wie ihre Struktur. Eine Auswahl der bekannten Wirkstoffe ist in Tabelle 1.2 angeführt. Am häufigsten bzw. am besten untersucht sind cytotoxische, antimikrobielle, fungizide, antitumor, antivirale, *antifouling*, entzündungs- und enzymhemmende Effekte der Sekundärmetaboliten.

Tabelle 1.2: Bioaktive Schwammmetaboliten (Quellen: Sarma et al. 1993; Munro et al. 1994).

Wirkung	Stoffklasse	Wirkstoff/Trivialname	Gattung
Antibakteriell	Alkaloide	Papuamine	<i>Haliclona</i>
	Alkaloide	Chelonine	<i>Chelonaplysilla</i>
	Bromopyrrole	Ageliferin	<i>Agelas</i>
	Terpenoide	Kalihinole, Palominin	<i>Acanthella</i>
	Sesterpene	kA ^{a)}	<i>Halichondria</i>
	Sterole	kA ^{a)}	<i>Dysidea</i>
Fungizid	Alkaloide	Stelletamid-A	<i>Stelletta</i>
	Alkaloide	Geodiamolide	<i>Geodia</i>
	Makrolide	Swinholid-A	<i>Theonella</i>
	Indole	Nortopsentin A-C	<i>Spongosorites</i>
Ichthyotoxisch	Sterole	Herbasterol	<i>Dysidea</i>
	Alkaloide	Topsentin	<i>Spongosorites</i>
	Sesterpene	Cacospongionolid	<i>Faciospongia</i>
Cytotoxisch	Alkaloide	Haliclamin A, Halitoxin	<i>Haliclona</i>
	Alkaloide	Mycalazine	<i>Mycale</i>
	Terpenoide	Smenospongine	<i>Smenospongia</i>
	Peptide	Axinastatin	<i>Axinella</i>
	Peptide	Phakellistatin	<i>Phakellia</i>
	Alkaloide	Topsentin, Nortopsentin	<i>Spongosorites</i>
Antitumor	Lactone	Discodermolid	<i>Discodermia</i>
	Makrolide	Swinholid	<i>Theonella</i>
	Makrolide	Halichondrine	<i>Halichondria</i>
	Alkaloide	Mycalamide	<i>Mycale</i>
	Alkaloide	Girollin	<i>Axinella</i>
Entzündungshemmend	Sesterpensulfate	kA ^{a)}	<i>Halichondria</i>
	Alkaloide	Chelonin A	<i>Chelonaplysilla</i>
Antiviral	Alkaloide	Dercitin	<i>Dercitus</i>
	Nucleoside	Arabinose	<i>Cryptotethya</i>
	Sesquiterpene	Avarol	<i>Dysidea</i>
	Alkaloide	Topsentin	<i>Topsenita</i>
Enzymhemmend	Sesterpene	Luffarielline	<i>Luffariella</i>
	Indole	Herbidole	<i>Axinella</i>
	Makrolide	Latrunculin	<i>Latrunculia</i>
	Tyrosinderivat	Aeroplysinin	<i>Verongia</i>
	Alkaloide	Oxysceptrin	<i>Agelas</i>

^{a)} kA = keine Angaben

2. METHODIK

2.1 Fragestellung

Obwohl die auf den Hartsubstraten der Nordsee vorkommenden Schwämme einen wichtigen Bestandteil der dortigen Lebensgemeinschaften darstellen und taxonomisch gut beschrieben sind (van Soest et al. 2000), ist bisher sehr wenig über ihre Chemie und Ökologie bekannt. Seit Jahrzehnten hält sich die Hypothese, dass in tropischen Gebieten lebende Organismen aufgrund des höheren „Räuberdrucks“ effektivere chemische Abwehrmechanismen entwickelt haben als verwandte Arten gemäßigter Breiten (Latitudinalhypothese, Green 1977). Auch wenn im Bereich der Nordsee die für warme Regionen typischen prädatorischen Fische fehlen, interagieren Schwämme hier mit einer Vielzahl an benthischen Organismen (vgl. Kapitel 1.2).

Ziel der Arbeit war es, einen Einblick in die chemische Ökologie der Schwammfauna kalt-gemäßigter Habitate zu gewinnen und zu beweisen, dass Nordseeschwämme Naturstoffe mit ähnlichem Potential zur chemischen Verteidigung enthalten wie Arten wärmerer Gewässer. Durch den Einsatz multidisziplinärer Methoden aus dem Bereich der Chemie, Ökologie und Mikrobiologie/Pharmakologie wurde das Metabolitenspektrum und die biologische Aktivität abundanter Arten untersucht und bezogen auf morphologische, taxonomische und ökologische Faktoren analysiert. Besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Vergleich zwischen großen ausdauernden Schwämmen und kleinen einjährigen Arten. Auf der Suche nach neuen Naturstoffen sollten Metaboliten chemisch interessanter und biologisch aktiver Schwämme isoliert und identifiziert werden.

Weiterführende Versuche im Hinblick auf eine biotechnologische Nutzbarkeit wurden exemplarisch an *Pachymatisma johnstonia* durchgeführt. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Hauptmetaboliten enthält der Schwamm?
- Sind biologisch aktive Metaboliten vorhanden und welche ökologische Bedeutung haben sie?
- Stammen die Metaboliten tatsächlich aus dem Schwamm oder werden sie von assoziierten Mikroorganismen produziert?
- Variiert der Metabolitengehalt innerhalb des Schwammes bzw. zwischen verschiedenen Individuen und Populationen?
- Wie verhalten sich die Tiere in der Hälterung?

2.2 Probennahme

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchten Schwämme wurden im Verlauf von zwei Forschungsfahrten mit der FS Heincke (Juli 2001 und Mai 2003) im Gebiet der Orkney- und Shetland-Inseln tauchend mittels SCUBA (*self-contained underwater breathing apparatus*) oder mit der Dredge gesammelt (vgl. Kapitel 1.2.1 und Abb. 2.1). Die untersuchten Schwämme sowie Daten zur Probennahme sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Im Anhang findet sich zu jeder Art eine genaue Beschreibung mit Fotos zum Habitus und den Nadeln.

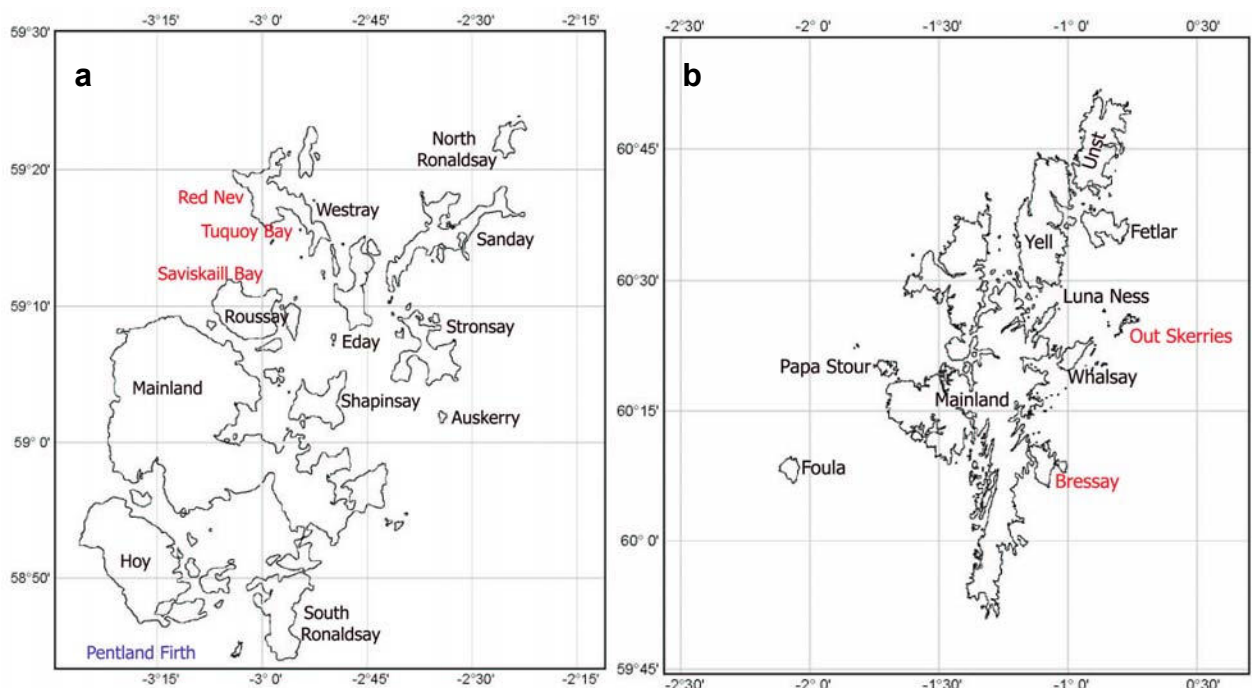


Abbildung 2.1: Fundorte (rot) der (a) Orkney- und (b) Shetland-Inseln (Quelle: verändert nach Hiscock 1998).

Unmittelbar nach dem Sammeln wurden die Schwammproben in auf dem Schiffsdeck installierte Hälterungsbecken mit fließendem Meerwasser überführt, und kleine Gewebeproben zur Herstellung von Nadelpräparaten entnommen (vgl. Kapitel 5.2.1). Danach wurden die Proben leicht gesäubert, die assoziierten Organismen abgesammelt und identifiziert. Die Bestimmung der Invertebraten erfolgte nach Hayward & Ryland (1995), die Algenarten wurden nach Brodie & Irvine (2003) bestimmt. Pro Schwammart wurden mindestens sieben, meist jedoch mehr als zehn Individuen untersucht. Anschließend wurde das Kanalwasser entfernt und die Schwämme, abhängig von der Fragestellung individuell oder nach Arten vereinigt, bis zur Extraktion bei -20°C eingefroren.

Die Proben wurden unter Berücksichtigung von morphologischen Merkmalen und anhand der Nadeln nach Literatur von van Soest & Picton (2000) bestimmt. Gewebeproben von Arten, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten (*Tetilla zetlandica*, *Haliclona*- und *Myxilla*-Arten), wurden am Zoologischen Museum der Universität Amsterdam (Niederlande) in der Arbeitsgruppe von Dr. Rob W. M. van Soest einer detaillierten taxonomischen Untersuchung unterzogen.

Tabelle 2.1: Übersicht der gesammelten Schwammarten (D=Dredge, T=Tauchen).

Kürzel	Art	Ordnung	Funddaten	Tiefe [m]	Fundort
SUSU	<i>Suberites suberia</i>	Hadromerida	2001 - D	~70	Bressay Island
CLCE	<i>Cliona celata</i>	Hadromerida	2001/03 - T	~15	Saviskaill Bay
PAJO	<i>Pachymatisma johnstonia</i>	Astrophorida	2001/03 - T	~15	Red Nev
ESFU	<i>Esperiopsis fucorum</i>	Poecilosclerida	2001/03 - T	5-10	Tuquoy Bay
SYCI	<i>Sycon ciliatum</i> *	Leucosolenida	2001 - T	5-10	Tuquoy Bay
LECO	<i>Leucosolenia complicata</i> *	Leucosolenida	2001/03 - T	5-10	Tuquoy Bay
PHVE	<i>Phakellia ventilabrum</i>	Halichondrida	2001/03 - D	~100	Out Skerries
MYRO	<i>Myxilla rosacea</i>	Poecilosclerida	2001 - T	5-10	Tuquoy Bay
MYIN	<i>Myxilla incrustans</i>	Poecilosclerida	2001 - T	~15	Saviskaill Bay
HARO	<i>Haliclona rosea</i>	Haplosclerida	2001 - T	~15	Red Nev
ISPA	<i>Isodictya palmata</i>	Poecilosclerida	2001 - T	~20	Bressay Island
HAPA	<i>Halichondria panicea</i>	Halichondrida	2001 - T	~10	Tuquoy Bay/Saviskaill Bay
TEZE	<i>Tetilla zetlandica</i>	Spirophorida	2001 - D	~70	Bressay Island
HACI	<i>Haliclona cinerea</i>	Haplosclerida	2001 - T	5-10	Tuquoy Bay
MYFI	<i>Myxilla fimbriata</i>	Poecilosclerida	2001 - T	~15	Red Nev
CLSP	<i>Clathrina</i> sp.*	Clathrinida	2001 - T	~15	Red Nev
AXIN	<i>Axinella infundibuliformis</i>	Halichondrida	2001 - D	~70	Bressay Island

* Calcarea (Kalkschwämme)

2.3 Chemische Methoden

Die gefriergetrockneten Schwammproben wurden zerkleinert und bei Raumtemperatur mit einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan/Methanol (1:1) extrahiert. Von diesem Rohextrakt wurde eine Probe zurückbehalten, und der Rest durch Ausschütteln gegen verschiedene Lösungsmittel in aufsteigender Polarität (*n*-Hexan, Ethylacetat, *n*-Butanol, Wasser) fraktioniert (vgl. Kapitel 5.1.1). Mit der Hexanphase sollen unerwünschte, unpolare Primärmetaboliten wie Fettsäuren abgetrennt werden. In der Wasserphase sammeln sich vorwiegend anorganische Substanzen und organische Salze. Interessante Naturstoffe erwartet man in der Essigester- und Butanolfraktion, in der sich entsprechend ihrer Polarität z.B. Terpene, Alkaloide oder Polyketide anreichern sollten. Um einen Überblick über das Metabolitenspektrum der Schwämme zu bekommen, wurden die Extrakte chemisch analysiert und einzelne Arten zur Isolierung bzw. Identifizierung der Hauptmetaboliten ausgewählt (siehe Abb. 2.2). Dabei kamen die nachfolgend beschriebenen Methoden zum Einsatz (vgl. Kapitel 5.1.2).

2.3.1 Chromatographische Methoden

Die Gelpermeations- oder Ausschluss-Chromatographie wurde unter Verwendung von Sephadex[®] LH-20 mit Methanol als Eluent zur Auftrennung der Fraktionen durchgeführt. Die Dünnschichtchromatographie diente zur Ermittlung geeigneter Elutionsgemische für die Säulenchromatographie und kam jeweils vor einer Trennung mittels Vakuum-Flüssig-Chromatographie (VLC) bzw. Niederdruck-Flüssig-Chromatographie (LPLC) zum Einsatz. Diese beiden Methoden wurden, ebenso wie die Gelpermeationschromatographie, zur Aufreinigung der Extrakte vor der HPLC-Trennung genutzt. Der letzte Schritt zur Gewinnung von Reinsubstanzen erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). Diese Methode diente zur präparativen Trennung von Substanzgemischen sowie deren qualitativer und quantitativer Analyse (vgl. Kapitel 5.1.2.1 und Abb. 2.2).

2.3.2 Spektroskopische Methoden

Die Strukturaufklärung der isolierten Substanzen erfolgte durch die Aufnahme kernmagnetischer Resonanzspektren (NMR-spektroskopisch). Die Auswertung der ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-NMR Daten wurde unterstützt durch massenspektrometrische Analysen. Die Kombination von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LCMS) diente neben der Ermittlung der Atommasse auch der Aufreinigung geringer Substanzmengen und dem Nachweis bereits identifizierter Substanzen (vgl. Kapitel 5.1.2.2 und Abb. 2.2).

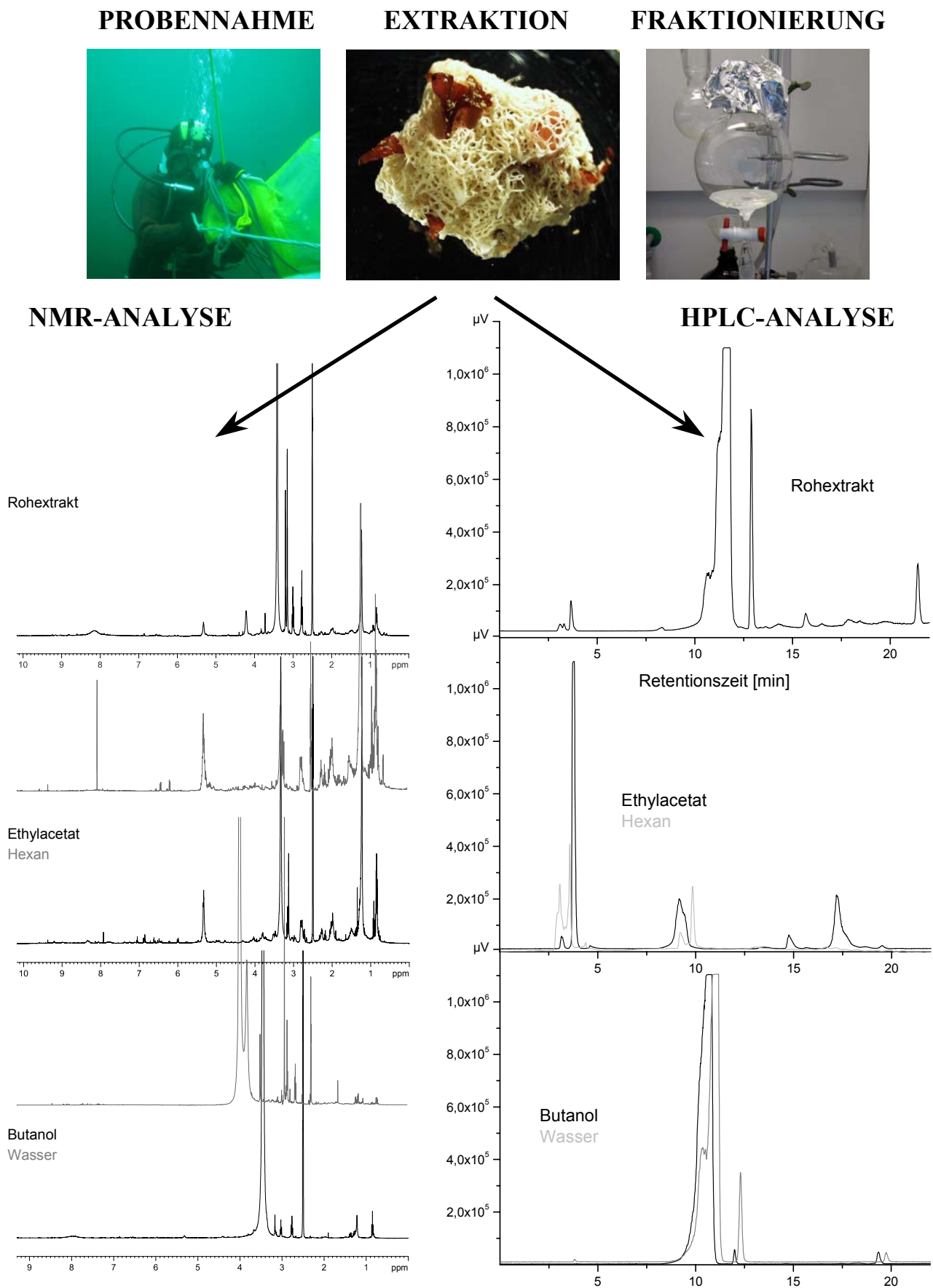


Abbildung 2.2: Aufarbeitung einer Schwammprobe am Beispiel von *Clathrina* sp. Extraktion und Fraktionierung mit den dazugehörigen Chromatogrammen und NMR-Spektren.

2.4 Biotests

Zum Nachweis von biologisch aktiven Substanzen in den Schwammextrakten wurden fünf verschiedene Biotests durchgeführt. Die ökologische Funktion der Metaboliten wurde in einem Freilandversuch zur Besiedlungshemmung und in Toxizitätstests mit unterschiedlichen Invertebratenlarven getestet. Versuche zur antimikrobiellen Wirkung, Enzyminhibition und Cytotoxizität sollten Aufschluss über das pharmakologische Potential der Schwämme geben. Die Bewertung der Versuchsergebnisse bezüglich signifikanter Hemmaktivität und Korrelationen zwischen biologischer Aktivität und morphologischen, taxonomischen sowie habitatspezifischen Parametern erfolgte unter Verwendung der in Kapitel 5.4 angeführten statistischen Methoden.

2.4.1 Toxizitätstests

Um Abwehrmechanismen gegenüber Konkurrenzarten zu untersuchen und generelle toxische Aktivität nachzuweisen, wurde die Wirkung der Schwammextrakte gegen Larven von *Halichondria panicea* (Porifera), *Polyclinum aurantium* (Ascidacea), *Carcinus maenas* und *Artemia salina* (Crustacea) getestet (vgl. Kapitel 5.4.1). Die Larven von *H. panicea* sind 1-2 mm klein, gelb und pantoffelförmig (Abb. 2.3a). Nach dem Verlassen des Muttertieres schwimmen sie einige Stunden mittels Wimpernschlag durch das Wasser. Nehmen sie ein geeignetes Substrat wahr, setzen sie sich fest und die Metamorphose beginnt. Anhand der Beobachtung dieses Verhaltens wurde die Toxizität der Schwammextrakte bewertet. Die Metamorphose von *Polyclinum aurantium* kennzeichnet sich durch die Ausstülpung von Haftpapillen und das Verkürzen des Schwanzes (Abb. 2.3b). Diese Stadien ließen sich unter dem Lichtmikroskop nur sehr schwer unterscheiden.

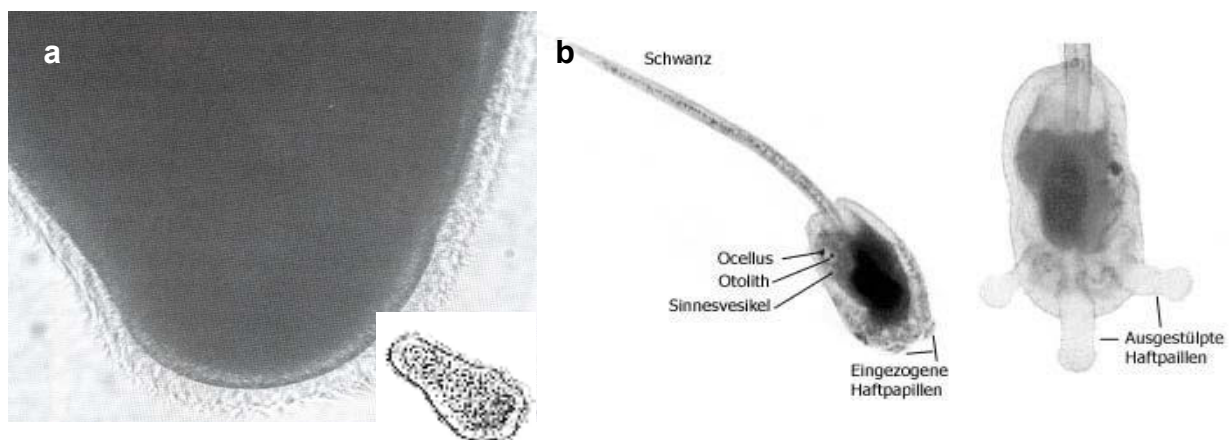


Abbildung 2.3: (a) Habitus einer Schwammlarve (Detaillaufnahme und Skizze), (b) schwimmende (links) und zum Festsetzen bereite Ascidienlarve (rechts) (Quelle: Young 2002).

Die Larven der Strandkrabbe *Carcinus maenas* eigneten sich ebenso wie die *Artemia*-Larven besonders gut zur Durchführung des Toxizitätsversuches, da sie entweder durch schnelle Bewegungen ihrer ersten Antennen herumschwammen oder tot am Gefäßboden lagen. So ließ sich die Wirkung der dem Hälterungswasser zugesetzten Extrakte gut bewerten. Bei dem mit *Artemia salina* durchgeführten *brine-shrimp-assay* handelt es sich um einen verbreiteten Standardtest zur Untersuchung der Toxizität. Zusätzlich wurde die cytotoxische Wirkung der Schwammextrakte bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig untersucht (vgl. Kapitel 5.4.6).

2.4.2 Phytagelversuch

Schwämme stehen vermutlich mit Artgenossen und anderen sessilen Invertebraten in Konkurrenz um Siedlungsfläche und müssen sich demzufolge vor Überwuchs (*Fouling*) schützen. Im Untersuchungsgebiet waren nur wenige Schwammarten mit anderen Organismen bewachsen. Es wurde daher angenommen, dass die Schwämme über bewuchshemmende Metaboliten (*Antifouling*-Substanzen) verfügen. Diese Hypothese sollte mit Hilfe eines aus ökologischer Sicht relevanten Biotests bestätigt werden (vgl. Kapitel 5.4.2). Dazu wurde die von Henrikson & Pawlik (1995) entwickelte Testmethode zur Untersuchung der *Antifouling*-Wirkung von Schwammextrakten abgewandelt. Als Versuchsfläche diente die dicht mit sessilen Invertebraten besiedelte Helgoländer Schwimmbadmole (Abb. 2.4). Diese Versuchsfläche gewährleistete mit den Habitaten der Probennahmestellen vergleichbare ökologische Bedingungen (Temperatur, Salzgehalt, Lichtklima, ähnliche Lebensgemeinschaften, hohen Larven- bzw. Sporendichte) (eigene Beobachtung). Der Versuch lief von April bis Juli 2003 und wurde durch die Ermittlung der Algendichte und der Häufigkeit von Bewuchsorganismen ausgewertet (vgl. Kapitel 5.4.3).



Abbildung 2.4: (a, c) Bewuchs an der Molenwand (Invertebraten, Algen), (b) Versuchsaufbau.

2.4.3 Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) –Test

Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) sind sekundäre Effektorenzyme, die durch zelluläre Botenstoffe gesteuert werden (Karlson 1994). Sie phosphorylieren Tyrosingruppen bestimmter Proteine der Zelle (sog. sekundäre Regulatoren), und lösen dadurch eine biologische Wirkung aus (Apoptose, Signalweiterleitung, Transkription, Zelltransformation, -proliferation und -differenzierung). Durch diese Funktion spielen PTKs bei Stoffwechselstörungen, Entzündungs- und Nervenkrankheiten sowie bei Krebs eine zentrale Rolle (Karlson 1994). Inzwischen wird außerdem vermutet, dass PTKs in die Larvalentwicklung von Invertebraten involviert sind, und das Festsetzen bzw. die Metamorphose der Larve beeinflussen (Fusetani 2004). Deshalb ist der durchgeführte Test sowohl in pharmazeutischer als auch ökologischer Hinsicht von Bedeutung. Die enzymhemmende Aktivität der Schwammextrakte wurde mit einem Protein-Tyrosin-Kinase-*Assay*-Kit (SIGMA, PTK101) bestimmt. Protein-Kinasen bilden eine heterogene Gruppe von Enzymen. Ihre Benennung erfolgt teils nach ihrem Aktivator, teils nach ihrer Substratspezifität. Die hier verwendete PTK ist EGFR (*epidermal growth factor*; vgl. Kapitel 3.3.4 und 5.4.4). Dieses Enzym phosphoryliert Tyrosinreste, die anschließend mit einem spezifisch bindenden Antikörper markiert und durch Zugabe einer Substratlösung angefärbt werden. Positive Proben erscheinen orangegelb und zeigen eine Enzymaktivität an (Abb. 2.5). Die Reaktionsstärke wird anschließend photometrisch, durch die Ermittlung der optischen Dichte (OD) bei 492 nm gemessen. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Hemmwirkung der Schwammextrakte bezogen auf den für die Positivprobe ermittelten, als 100% Enzymaktivität definierten Messwert berechnet, und abhängig von dem bekannten PTK-Inhibitor Piceatannol (Abb. 3.17) bewertet (vgl. Kapitel 5.4.4). Dadurch ergab sich die nachfolgende Klassifizierung:

- <40% Hemmeffekt = * stark (0-11%) ** deutlich (12-22%) *** schwach (23-40%)
- 41-140% keine Hemmung
- >141% Enzymaktivierung



Abbildung 2.5: PTK-Test: farblose Proben zeigen Enzyminhibition, gelbe Enzymaktivität an.

2.4.4 Hemmhoftest

Antibakterielle Wirkung wurde bereits für Schwämme aus Neuseeland (Bergquist & Bedford 1978), der Karibik (Newbold et al. 1999), dem Mittelmeer (Amade et al. 1987), Polynesien (Amade et al. 1982) und Kalifornien (Thompson et al. 1985) nachgewiesen. Um die Aktivität der Nordseeschwammextrakte zu testen, wurde ein Agardiffusions- oder Hemmhoftest (Zähner 1965; Drews 1976) durchgeführt, bei dem sowohl ökologisch als auch pharmakologisch interessante Bakterien verschiedener taxonomischer Gruppen zum Einsatz kamen (vgl. Kapitel 5.4.3). Die Bewertung der antimikrobiellen Aktivität erfolgte durch das Ausmessen der entstandenen Inhibitionszonen und wurde wie folgt eingeteilt:

- Hemmradius <1 mm = geringe Aktivität (*)
- Hemmradius 1-2,5 mm = mittlere Aktivität (**)
- Hemmradius >2,5 mm = starke Hemmwirkung (***)

2.5 Weiterführende Versuche

Detailliertere Studien an ausgewählten Schwammarten sollten zusätzliche Informationen zu der Funktion der Naturstoffe liefern. Zur Lokalisierung der Sekundärmetaboliten im „Gewebe“ wurden Schwämme getrennt nach Pinacoderm und Mesohyl extrahiert (vgl. Kapitel 5.2.2). Eine zusätzliche Separation von Schwamm- und Bakterienzellen sollte Aufschluss über die Herkunft der Substanzen geben (vgl. Kapitel 5.2.3). Außerdem wurde das Verhalten einiger Arten während ihrer Hälterung unter besonderer Berücksichtigung der Biosyntheseaktivität überprüft (vgl. Kapitel 5.3). Die Untersuchung der Schwämme *Phakellia ventilabrum*, *Esperiopsis fucorum*, *Leucosolenia complicata*, *Cliona celata* und *Pachymatisma johnstonia* bezüglich der Abgabe von Metaboliten ans Meerwasser (vgl. Kapitel 5.1.4) und des Gehaltes an Mikroorganismen (vgl. Kapitel 5.2.4) sollte nähere Informationen über die Zusammenhänge zwischen chemischen, morphologischen und biologischen Aspekten liefern.

Alle angesprochenen Versuche wurden auch zur Untersuchung der chemischen Ökologie von *Pachymatisma johnstonia* eingesetzt (vgl. Kapitel 3.5). Dabei sollten Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten in Bezug auf die biologische Aktivität und Naturstoffproduktion bei Kalk- und Kieselschwämmen aufgezeigt werden.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Vergleichende chemische Studien an Nordseeschwämmen

Nachfolgend werden die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen und HPLC-chromatographischen Untersuchungen der Rohextrakte und Fraktionen von 17 abundanten Nordseeschwämmen vorgestellt sowie Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich Metabolitengehalt und -zusammensetzung diskutiert.

3.1.1 Extraktion der Schwammarten

Bei 15 von 17 Schwammarten machten die in Dichlormethan/Methanol löslichen Bestandteile zwischen 14% und 25% des wasserfreien Schwammgewebes aus. Das entspricht einem Mittelwert von $20\% \pm 5,2$ (Tab. 3.1). Abweichend davon war die Ausbeute bei *Tetilla zetlandica* mit 9% sehr gering, während *Myxilla fimbriata* einen besonders hohen Anteil an organischen Substanzen enthielt (29%).

Tabelle 3.1: Extraktausbeute und natürliche Konzentration der Schwammmetaboliten im Vergleich. (R=Rohextrakt, H=Hexan-, E=Ethylacetat-, B=Butanol-, W=Wasserfraktion).

Schwammart	Einwaage		Ausbeute ^{a)}	Anteil am Extrakt				K _n ^{b)}
	FG [g]	TG [g]		H [%]	E [%]	B [%]	W [%]	
<i>Suberites suberia</i>	518	73,99	20,9	22,3	1,5	11,8	29,9	29,90
<i>Cliona celata</i>	3870	774,41	18,5	15,2	1,2	5,8	11,6	36,99
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	3180	529,77	24,7	9,9	22,2	7,4	14,3	41,21
<i>Esperiopsis fucorum</i>	2970	329,81	18,9	17,0	1,6	5,9	28,5	20,96
<i>Sycon ciliatum</i>	520	63,66	17,4	3,3	1,5	5,9	62,1	21,31
<i>Leucosolenia complicata</i>	480	57,84	18,7	2,3	2,1	6,4	58,4	22,52
<i>Phakellia ventilabrum</i>	1150	141,70	23,1	15,3	11,1	3,8	35,8	28,40
<i>Myxilla rosacea</i>	2832	515,23	25,6	5,3	0,3	6,4	8,1	46,55
<i>Myxilla incrustans</i>	1183	168,73	24,5	16,5	0,9	4,6	20,7	34,93
<i>Haliclona rosea</i>	360	59,07	16,5	7,6	1,9	6,3	22,8	26,83
<i>Isodictya palmata</i>	815	164,88	21,8	33,0	1,2	8,8	46,2	44,04
<i>Halichondria panicea</i>	950	189,92	13,9	39,7	0,7	16,2	23,4	27,78
<i>Tetilla zetlandica</i>	42	12,15	9,1	-	-	-	-	26,43
<i>Haliclona cinerea</i>	1710	342,65	26,8	7,3	1,5	3,8	12,5	53,64
<i>Myxilla fimbriata</i>	506	92,22	29,3	13,7	1,3	8,3	33,8	53,42
<i>Clathrina</i> sp.	40	5,57	15,3	-	-	-	-	21,25
<i>Axinella infundibuliformis</i>	53	7,49	17,4	-	-	-	-	24,53

^{a)} bezogen auf das Trockengewicht (TG)

^{b)} Natürliche Konzentration, bezogen auf 1 g frisches Schwammgewebe (FG)

Bezogen auf das Frischgewicht betrug die natürliche Metabolitenkonzentration im Schwammgewebe durchschnittlich 33 ± 11 mg/g. Das entspricht einem Anteil von $3 \pm 1,2\%$ bezogen auf das Frischgewicht. Van de Vyver et al. (1990) extrahierten mit Methanol einen Substanzanteil von 2% in vergleichbaren Schwammarten. In den Kalkschwämmen (22 mg/g) war die Metabolitenkonzentration um ein Drittel geringer, in *Haliclona cinerea* (54 mg/g) und *Myxilla fimbriata* (53 mg/g) etwa anderthalb mal so groß wie bei den meisten anderen Schwammarten. Der Metabolitengehalt scheint von der Lebensweise und Morphologie der Schwammarten abhängig zu sein. Die Kalkschwämme und andere kleinwüchsige, einjährige Arten ohne deutliche Gliederung in Außen- und Innenschicht enthalten weniger organische Substanz als große, langlebige Schwämme mit ausgeprägtem Mesohyl. Da der Stoffwechsel saisonaler Arten auf ein vergleichsweise schnelles Wachstum und Reproduktion innerhalb kurzer Zeit ausgerichtet sein muss, spielt die Produktion von Sekundärmetaboliten bei diesen Arten vermutlich eine untergeordnete Rolle. Ausdauernde Schwämme müssen sich über einen Zeitraum von mehreren Jahren in ihrem Lebensraum behaupten und besitzen keine Möglichkeit, Konkurrenzorganismen auszuweichen. Der evolutive Druck, effektive Verteidigungsmechanismen (biologisch aktive Substanzen, morphologische Strukturen) zu entwickeln bzw. die Regenerationsfähigkeit durch strukturelle Reserven aufrechtzuerhalten, ist daher vermutlich höher als bei kurzlebigen Arten. Für alle Schwämme, ausgenommen *Pachymatisma johnstonia* und *Phakellia ventilabrum*, gilt, dass sich in der Essigesterphase nur sehr wenige Substanzen lösen. Der Anteil der in der Wasserphase löslichen Metaboliten betrug im Mittel 30%. Bei den Kalkschwämmen *Leucosolenia complicata* und *Sycon ciliatum* sind es 60%. Dieser hohe Anteil an polaren Substanzen bereitete teilweise Probleme bei der Aufarbeitung.

3.1.2 Qualitative HPLC-Analyse der Rohextrakte

Die Schwammrohextrakte ließen sich nicht mittels Umkehrphasen-Chromatographie auftrennen. Es waren viele schlecht getrennte Signale bei einer Retentionszeit von t_0 bis $t_R=10$ min oder nach $t_R > 60$ min detektierbar. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die extrahierten, polaren Substanzen wenig Wechselwirkung mit der stationären Phase zeigten und deshalb mit dem Eluenten von der Säule gespült wurden. Andererseits enthielten die Extrakte auch sehr unpolare Komponenten, die sich nur selten in der mobilen Phase aufhielten, wodurch sich sehr lange Retentionszeiten ergaben. Die HPLC-Analytik über eine Diol-Säule eignete sich besser zur Auftrennung der Nordseeschwammextrakte. Mit dieser Methode waren gut getrennte Signale im Bereich von $t_R=8$ min bis $t_R=30$ min zu sehen. Durch einen Vergleich der Retentionszeiten

konnten die 17 Schwammarten charakteristischen Metabolitenprofilen zugeordnet werden (Abb. 3.1). Alle untersuchten Organismen zeigten hohe Konzentrationen von Substanzen mit einer Retentionszeit $t_R=10$ min bis 11 min. Weitere gemeinsame Hauptmetaboliten waren bei $t_R=12,9$ min und $t_R=19,6$ min zu beobachten. Mit Ausnahme von *Cliona celata*, *Axinella infundibuliformis*, *Tetilla zetlandica* und *Clathrina* sp. enthielten alle Schwämme Substanzen mit einer Retentionszeit von $t_R=19,6$ min (Abb. 3.1). Das bei einer Retentionszeit von $t_R=12,9$ min detektierte Signal ist besonders konzentriert in *Clathrina* sp. und *Haliclona cinerea* zu finden. Nur die *Haliclona*-Arten zeigten beide Substanzen, *H. cinerea* sogar in hoher Konzentration. Für *Leucosolenia complicata*, *Sycon ciliatum*, *Haliclona rosea* und *H. cinerea* sowie für die als Poecilosclerida klassifizierten Schwämme entspricht diese Gruppierung auch der taxonomischen Einordnung nach Hooper & van Soest (2002) (Tab. 3.2). Beim Vergleich der Retentionszeiten muss beachtet werden, dass es im Rohextrakt zu Überlagerungseffekten kommen kann, und sich damit unter breiten Signalen mit hoher Intensität oft mehrere Substanzen verbergen.

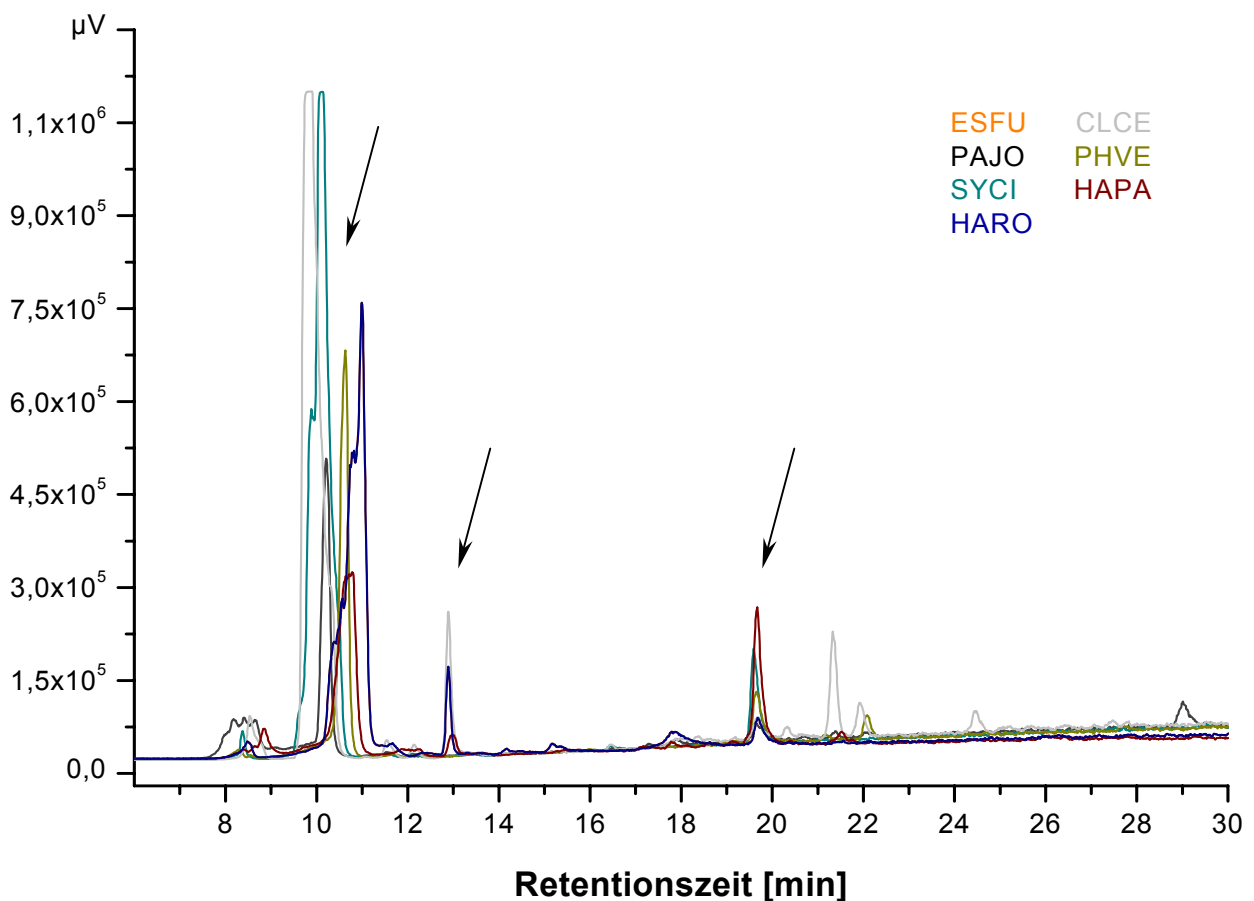


Abbildung 3.1: HPLC–Profile der Rohextrakte am Beispiel von sieben Schwammarten. Pfeile markieren die gemeinsamen Metaboliten bei einer Retentionszeit von $t_R=10$ -11 min, $t_R=12,9$ min und $t_R=19,6$ min. Abkürzungen der Schwammarten siehe Tab. 2.1 (S. 23). (Säule: Diol-Kromasil-RP18 (4,6 x 250 mm, 7 μm), Gradient: 100% ACN für 25 min, 50% H_2O /ACN 30 min, 50% MeOH/ H_2O 40 min, 100% MeOH 45 min, Flußrate: 1 ml/min).

Die oben angesprochenen Retentionszeiten wurden mit dem Lichtstreuendetektor aufgezeichnet. UV-absorbierende Substanzen waren selten nachweisbar. Nur die Rohextrakte von *Cliona celata*, *Tetilla zetlandica*, *Haliclona cinerea*, *Axinella infundibuliformis*, *Pachymatisma johnstonia* und *Isodictya palmata* zeigten Signale im UV- Bereich.

Tabelle 3.2: Gegenüberstellung der Retentionszeiten zum Vergleich der Hauptmetaboliten-zusammensetzung der Schwämme (XX=sehr hohe, X=hohe, x=geringe Konzentration).

Schwamm	Taxon (Ordnung)	Retentionszeiten [min]							
		8	~10	12,9	19,6	21	22	27	29
<i>Esperiopsis fucorum</i>	Poecilosclerida		XX		XX				
<i>Myxilla rosacea</i>	Poecilosclerida		XX		X				
<i>Myxilla incrustans</i>	Poecilosclerida		XX		X				
<i>Isodictya palmata</i>	Poecilosclerida		X		X				
<i>Myxilla fimbriata</i>	Poecilosclerida		X		X				
<i>Sycon ciliatum</i> *	Leucosolenida		XX		X				
<i>Leucosolenia complicata</i> *	Leucosolenida		XX		X				
<i>Phakellia ventilabrum</i>	Halichondrida		X		X		x		
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	Astrophorida	x	X		X				x
<i>Suberites suberia</i>	Hadromerida	x	x	x	X	x			
<i>Halichondria panicea</i>	Halichondrida	x	X	x	X	x			
<i>Haliclona rosea</i>	Haplosclerida		X	XX	XX				
<i>Haliclona cinerea</i>	Haplosclerida			x	X				
<i>Cliona celata</i>	Hadromerida	x	XX	X		x	x		
<i>Axinella infundibuliformis</i>	Halichondrida	x	X	X		x	x	x	
<i>Tetilla zetlandica</i>	Spirophorida		XX	X		x	X		x
<i>Clathrina</i> sp.*	Clathrinida		XX	XX		X			

* Calcarea (Kalkschwämme)

3.1.3 Qualitative NMR-Analyse der Rohextrakte

Ein Vergleich der Signalmuster in den ^1H -NMR-Spektren der Schwammrohextrakte ergab eine partiell von der HPLC-Analyse verschiedene Einteilung der Arten (Tab. 3.3). *Halichondria panicea* und *Suberites suberia*, die zuvor keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, zeigten nun mit den Poecilosclerida vergleichbare Signale. *Isodictya palmata* fiel aus dieser Gruppe heraus und wies ein Spektrum auf, welches eher *Tetilla zetlandica* und *Axinella infundibuliformis* ähnelte. Während sich *Cliona celata* und *Clathrina* sp. anhand der HPLC-Analyse keiner Gruppe zuordnen ließen, ähnelten ihre NMR-Spektren denjenigen der *Haliclona*-Arten (Abb. 3.2).

Tabelle 3.3: Qualitativer Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der Schwammrohextrakte.

Art	Taxon	Beschreibung des ^1H -Spektrums
<i>Sycon ciliatum</i> *	Leucosolenida	wenige, gut getrennte Signale von 2-3 ppm
<i>Leucosolenia complicata</i> *	Leucosolenida	
<i>Suberites suberia</i>	Hadromerida	mittlere Signaldichte, verteilt zwischen 1 und 9 ppm; wenige schwache Signale im tieffeldigen Bereich; wenige starke Signale im Hochfeld; charakteristisches Signal bei 5,3 ppm
<i>Esperiopsis fucorum</i>	Poecilosclerida	
<i>Myxilla rosacea</i>	Poecilosclerida	
<i>Myxilla incrustans</i>	Poecilosclerida	
<i>Halichondria panicea</i>	Halichondrida	
<i>Myxilla fimbriata</i>	Poecilosclerida	
<i>Phakellia ventilabrum</i>	Halichondrida	wenige, getrennte Signale zwischen 3- 8 ppm; keine Fettsäuresignale
<i>Cliona celata</i>	Hadromerida	zwei charakteristische Triplets bei 3 ppm; hohe Signaldichte zwischen 2,5-3 ppm; schwaches Signal bei 5,3 ppm und im aromatischen Bereich bei 8 ppm
<i>Haliclona rosea</i>	Haplosclerida	
<i>Haliclona cinerea</i>	Haplosclerida	
<i>Clathrina</i> sp.*	Clathrinida	
<i>Isodictya palmata</i>	Poecilosclerida	viele intensive Signale zwischen 2,5-4,5 ppm; viele schwächere zwischen 7,5-9 ppm
<i>Tetilla zetlandica</i>	Spirophorida	
<i>Axinella infundibuliformis</i>	Halichondrida	
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	Astrophorida	viele schlecht aufgelöste Signale von 0,5-8 ppm

* Calcarea (Kalkschwämme)

Während sich die Naturstoffsuche im Allgemeinen auf chemisch interessante, durch UV-Aktivität und ^1H -NMR-Signale im tieffeldigen Bereich gekennzeichnete Substanzen konzentriert, wurden bei den Nordseeschwämmen überwiegend Bestandteile ohne UV-Absorption und mit ^1H -Signalen im Hochfeld detektiert. Die Ergebnisse der analytischen HPLC und die NMR-Daten lassen darauf schließen, dass aromatische und olefinische Verbindungen eher in geringen Mengen in den untersuchten Nordseeschwämmen vorkommen.

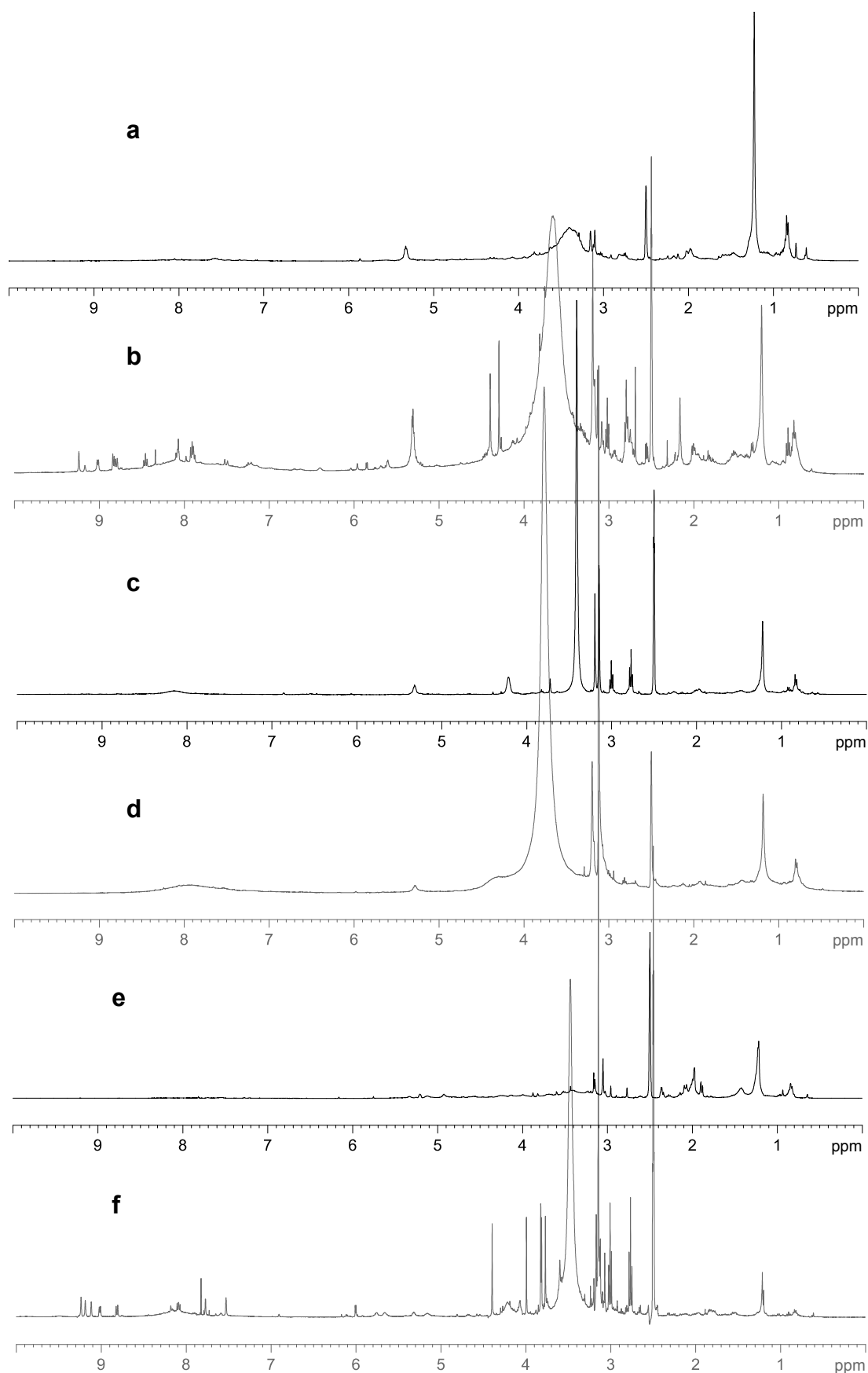


Abbildung 3.2: Vergleich der für die Nordseeschwämme charakteristischen ^1H -NMR-Spektren am Beispiel der Rohextrakte von (a) *Suberites suberia*, (b) *Isodictya palmata*, (c) *Clathrina* sp., (d) *Sycon ciliatum*, (e) *Pachymatisma johnstonia* und (f) *Axinella infundibuliformis*.

3.1.4 Isolierung und Identifizierung der „Hauptmetaboliten“

Anhand der NMR-Daten und der Aktivität in den antilarvalen und antimikrobiellen Biotests wurden die Schwämme *Pachymatisma johnstonia*, *Phakellia ventilabrum*, *Isodictya palmata*, *Myxilla fimbriata* sowie *Cliona celata*, *Sycon ciliatum* und *Leucosolenia complicata* als die chemisch und ökologisch interessantesten Organismen für eingehendere Untersuchungen ausgewählt (vgl. Kapitel 3.4 und 3.5). Aufgrund der umfangreichen Publikationen zur Chemie von *C. celata* wurde diese Art nicht weiter bearbeitet. Die Analyse von *S. ciliatum* wurde eingestellt, weil nur geringe Substanzmengen zur Verfügung standen. *Leucosolenia complicata* erwies sich als extrem metabolitenarm. Die Rohextrakte von elf getrennt extrahierten Individuen zeigten ausschließlich Signale ohne UV-Aktivität im Bereich von $t_R=10$ bis 11 min auf der Diolsäule. Außerdem kristallisierten die polaren Verbindungen auf den LC-Säulen aus, was die Bestimmung der Atommasse mittels LCMS verhinderte. Da zudem im NMR-Spektrum nur sehr wenige Signale zu sehen waren, gelang die Identifizierung der Substanzen bisher nicht.

Nach einer Analyse der Hauptbestandteile von *I. palmata*, *P. johnstonia*, *M. fimbriata* und *P. ventilabrum* konnten die in Kapitel 3.1.3 angesprochenen und für die untersuchten Nordseeschwämme typischen Metaboliten benannt werden (Abb. 3.3). Unter den Signalen mit einer Retentionszeit im Bereich von $t_R=10$ bis 11 min waren bei den genannten Trennbedingungen die Nucleoside Inosin (**1**) und Allantoin (**2**) zu finden (Abb. 3.3). Eine Aufklärung des Signals bei einer Retentionszeit von $t_R=12,9$ min war bisher, aufgrund der bereits für *L. complicata* beschriebenen Schwierigkeiten, nicht möglich. Unter dem Signal bei $t_R=19,6$ min verbargen sich Homarin (N-Methylpyridin-2-carboxylat, **3**) und Trigonellin (N-Methylnicotinsäure, **4**). Durch Vergleiche des UV-Absorptionsmusters aller Schwammextrakte wurde deutlich, dass *Esperiopsis fucorum*, *L. complicata*, *Halichondria panicea*, *Tetilla zetlandica*, *I. palmata* und *C. celata* Homarin (**3**) enthalten.

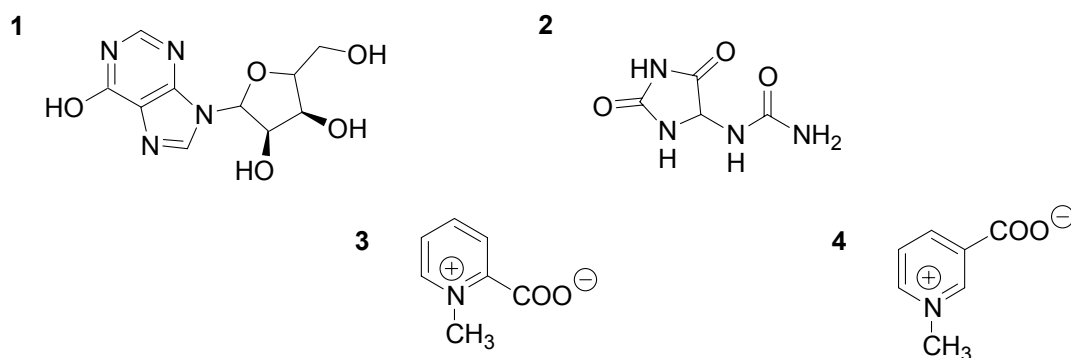


Abbildung 3.3: In Nordseeschwämmen verbreitete Substanzen: Inosin (**1**), Allantoin (**2**), Homarin (**3**) und Trigonellin (**4**).

Die für die untersuchten Schwämme identifizierten Strukturen und für die jeweilige Gattung bereits bekannten Substanzen bzw. Substanzklassen sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt. Die analytischen und spektroskopischen Daten zur Charakterisierung der identifizierten Naturstoffe werden in Kapitel 3.4 bei den Schwammarten besprochen, aus denen sie isoliert wurden. Ebenso wie für Schwammarten anderer Gebiete von van Soest & Braekman (1999) beschrieben, ist auch für die Nordseearten eine Chemotaxonomie nicht möglich.

Tabelle 3.4: Bekannte Naturstoffe der untersuchten Taxa (Quelle: Blunt & Munro 1998).

Taxonomie		Metaboliten	
Art	Taxon	bekannt	nachgewiesen
<i>Suberites suberia</i>	Hadromerida	Aaptamin, Luteon, Furodysin, Suberitenon	-
<i>Cliona celata</i>	Hadromerida	Clionamid, Variabilin, Celenamid	Homarin
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	Astrophorida	Sterole, L-6-Bromohypaphorin, Nucleoside, Pachymatismin	Trigonellin, L-6-Bromohypaphorin, Betain, N,N,N-Trimethyl- β -alanin
<i>Esperiopsis fucorum</i>	Poecilosclerida	Sterole	Allantoin, Homarin
<i>Sycon ciliatum</i>	Leucosolenida	-	-
<i>Leucosolenia complicata</i>	Leucosolenida	-	Homarin
<i>Phakellia ventilabrum</i>	Halichondrida	Pyrrol- und Pyridinderivate	Trigonellin, Homarin, Zooanemonin
<i>Myxilla rosacea</i>	Poecilosclerida	Terpenoide, Pallescensin, Luteon, Furodysin	-
<i>Myxilla incrustans</i>	Poecilosclerida	Terpenoide, Pallescensin, Luteon, Furodysin	-
<i>Haliclona rosea</i>	Haplosclerida	Fettsäuren, Sterole	-
<i>Isodictya palmata</i>	Poecilosclerida	Purine, Nucleoside	Inosin, Trigonellin, Homarin
<i>Halichondria panicea</i>	Halichondrida	u.a. Sterole, Terpenoide, Glycolipide	Homarin
<i>Tetilla zetlandica</i>	Spirophorida	Tetillapyron, Nortetillapyron,	Homarin
<i>Clathrina clathrus</i>	Clathrinida	Clathridin, Clathridin-Zn-Komplex	-
<i>Clathrina coriacea</i>	Clathrinida	Coriacenin, Oceanapsid, Staurosporin	-
<i>Haliclona cinerea</i>	Haplosclerida	Fettsäuren, Sterole	-
<i>Myxilla fimbriata</i>	Poecilosclerida	Terpenoide, Pallescensin, Luteon, Furodysin	Allantoin, Morpholin
<i>Axinella infundibuliformis</i>	Halichondrida	u.a. Sterole, Carotenoide, Sesquiterpene, Pyrrolimidazole	-

Geht man davon aus, dass die gewählte Aufreinigungsmethode eine Isolierung aller Sekundärmetaboliten zulässt, scheinen kleine, stickstoffhaltige Verbindungen in den Nordseeschwämmen zu dominieren. Aus Schwämmen anderer Habitats wurden hingegen vor allem UV-aktive, aromatenhaltige Naturstoffe isoliert (z.B. van Soest & Braekman 1999; Faulkner 2001; Blunt et al. 2003). Das bedeutet jedoch nicht, dass in diesen Schwämmen kleine, stickstoffhaltige Verbindungen selten sind, sondern deutet vielmehr an, dass sich die Naturstoffsuche bisher fast ausschließlich auf chemisch oder pharmakologisch „interessante“, und somit meist UV-aktive Verbindungen konzentrierte. So stießen beispielsweise Mourabit et al. (1997) im Laufe der Aufreinigung einer Schwammprobe (*Cymbastela cantharella*, Neu Kaledonien) zur Extraktion von Girollin, einer Substanz mit cytotoxischer Wirkung, in der polarsten Fraktion auf Allantoin (2), Homarin (3) und Trigonellin (4).

Da Homarin (3) und Trigonellin (4) in vielen marinen Organismen aus unterschiedlichen Taxa vorkommen, handelt es sich vermutlich um phylogenetisch alte, ubiquitäre Substanzen mit einem einfachen Biosyntheseweg (vgl. Kapitel 3.4). Das in marinen Invertebraten weit verbreitete Homarin (3) wurde zum ersten Mal von Hoppe-Seyler (1933) aus Hummerfleisch isoliert. Es soll in dem australischen Schwamm *Spongosuberites* sp. und in der antarktischen Schnecke *Marseniopsis mollis* fraßabschreckend gegen andere Mollusken bzw. den Seestern *Odontaster calidus* wirken (Scheuer 1973; Miki et al. 1996). Homarin (3) wurde in den Geweben von *Marseniopsis mollis* in Konzentrationen von 6-24 mg/g Trockengewicht nachgewiesen. Target et al. (1983) beschrieben, dass Homarin (3) die Ansiedlung von Diatomeen auf Gorgonien (Cnidaria) verhindert, jedoch inaktiv gegen Seepockenlarven ist. Deren Ansiedlung wiederum wird durch Trigonellin (4) gehemmt (Miki et al. 1996). Homarin (3) wurde außerdem als morphogenetisch aktive Substanz in *Hydractinia echinata* (Cnidaria) identifiziert. Hier verhindert es die Umwandlung der Larve zum Adultus und verändert das Muster adulter Strukturen. Auch Trigonellin findet man in den Geweben von *Hydractinia echinata* und zwar in ca. 1/3 der Konzentration des Homarins (3) (Berking 1987). Trigonellin wurde 1885 von Jahns in Samen des Bockshornklees (*Trigonellum foenum graecum*) entdeckt, und von Ackermann (1953) zum ersten Mal in einem marinen Invertebraten (*Anemonia sulcata*, Cnidaria) nachgewiesen. Trigonellin (4) ist zudem Bestandteil des Kaffees und soll für dessen bitteren Geschmack verantwortlich sein sowie vor Karies schützen (Daglia et al. 2002).

Das Purinderivat Inosin (1) ist als Nucleosid-Baustein von RNA und DNA bekannt und somit ein Primärmetabolit. Es ist an der Proteinbiosynthese und am Zuckerstoffwechsel beteiligt und aktiviert viele Enzyme. In den Biotests mit Protein-Tyrosin-Kinase wurde jedoch keine aktivierende Wirkung festgestellt (vgl. Kapitel 3.3.4). Durch den Abbau der Purinbasen, also

auch durch den Abbau von Inosin (**1**), kann im Stoffwechsel Allantoin (**2**) gebildet werden. Während der Purinabbau beim Menschen mit der Oxidation zur Harnsäure endet, wird diese bei den meisten anderen Säugetieren zu Allantoin (**2**) oder Allantoinsäure abgebaut (Karlson et al. 1994, siehe Abb. 3.4). Xanthin ist das Ausgangsprodukt für die Biosynthese von Purin-Alkaloiden (z.B. methylierte Verbindungen wie Theophyllin und Coffein vgl. Kapitel 3.5.1). Während Coffein und Theophyllin Signalweiterleitungsprozesse durch die Hemmung der Phospho-diesterase beeinflussen, besitzen andere Purin-Analoga (8-Azaguanin, 6-Mercaptopurin) antibiotische und cytostatische Wirkungen (Karlson et al. 1994).

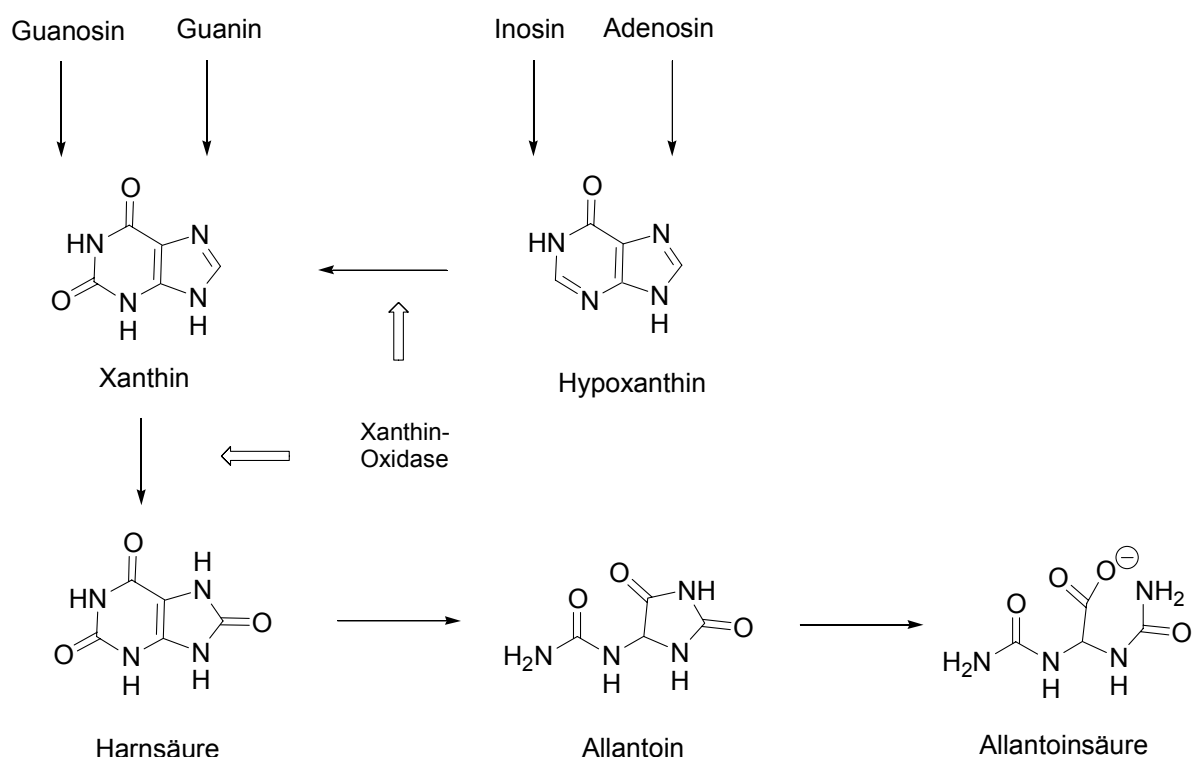


Abbildung 3.4: Umsetzung von Inosin zu Allantoin (verändert nach Karlson 1994).

Eng mit dem Purinstoffwechsel verbunden ist auch die Synthese aller anderen aus den Nordseeschwämmen isolierten Verbindungen. Die Purine stellen ebenso wie einfache Amine, Aminosäuren und deren Derivate wichtige Bausteine bzw. Vorstufen komplexer Naturstoffe dar, oder sind selbst Substanzen mit einzigartiger biologischer Aktivität (Luckner 1969; Scheuer 1973). Dazu zählen auch die im Verlaufe der hier vorgestellten Arbeit isolierten Pyridinium-alkaloide Homarin (**3**) und Trigonellin (**4**) sowie N,N,N-Trimethyl- β -alanin (**11**), Betain (**12**) und L-6-Bromohypaphorin (**13**). Wie alle diese Substanzen über verschiedene Biosynthesewege miteinander in Verbindung stehen, wird in Kap. 3.5 erläutert (siehe Abb. 3.27 und 3.28).

3.1.5 Metabolitenfreisetzung

Um festzustellen, ob Schwämme Substanzen ins umgebende Meerwasser absondern, wurden die organischen Bestandteile aus dem Hälterungswasser von *Phakellia ventilabrum*, *Leucosolenia complicata*, *Cliona celata*, *Esperiopsis fucorum* und *Pachymatisma johnstonia* über C18-Säulen angereichert. Die Elution dieser Säulen zeigte, dass nur geringe Substanzmengen (0,1 bis 2 mg) aus dem Wasser extrahiert werden konnten (Tab. 3.5). Auch diese Extrakte wurden HPLC-chromatographisch untersucht und sowohl untereinander als auch mit den Chromatogrammen der Schwammextrakte verglichen. Die Eluatextrakte der einzelnen Schwämme unterschieden sich nicht, und auch die charakteristischen Schwammmetaboliten (z.B. Homarin, Trigonellin, Inosin, Allantoin) konnten nicht detektiert werden. Somit ließ sich die Abgabe von Metaboliten an das Meerwasser nicht nachweisen.

Tabelle 3.5: Datenübersicht zum Versuch des Nachweises von Schwammmetaboliten im umgebenden Meerwasser. Abkürzungen der Schwammnamen siehe Tabelle 2.1.

Schwammart	V _{Wasser} [l]	V _{Schwamm} [ml]	FG [g]	TG [g]	Roh [g]	K _{nRoh} [mg/ml]	C18 [mg]	K _{nC18} [mg/ml]
PAJO_b ^{a)}	5	540	438,40	80,49	15,86	29,37	115,60	0,21
PAJO_u ^{b)}	5	350	327,82	55,77	11,32	32,34	172,10	0,49
CLCE_u	9	2200	2128,78	542,96	70,43	32,01	239,10	0,11
ESFU_b	2	100	138,50	12,53	3,00	30,02	109,40	1,09
ESFU_u	2	200	155,74	19,80	3,71	18,53	198,20	0,99
LECO_u	1	120	126,34	10,44	2,93	24,42	150,20	1,25
PHVE_u	15	260	373,31	63,08	6,72	25,84	514,10	1,98

^{a)} mit Epibionten bewachsen

^{b)} unbewachsen, frei von Epibionten

Aufgrund der in Kapitel 3.1.2 erläuterten Polarität der in den Nordseeschwämmen häufigen Metaboliten war eine Anreicherung dieser Substanzen auf dem C18-Material unwahrscheinlich. Da jedoch Schulte et al. (1991) mit einem ähnlichen, im Freiland durchgeführten Versuch die Sekretion von Allomonen bei Korallen zeigen konnten, wurde diese Methode gewählt.

Ob und in welchen Mengen Schwämme tatsächlich aktive Substanzen abgeben, ist bisher weitgehend unerforscht. Untersuchungen an *Aplysina fistularis* (Thompson et al. 1985; Walker et al. 1985) und *Ircinia felix* (Dunque et al. 2001) hingegen belegen die Sekretion toxischer Substanzen. Auch wenn mit der hier verwendeten Methode eine Metabolitenausscheidung für *P. ventilabrum*, *P. johnstonia*, *L. complicata*, *C. celata* und *E. fucorum* nicht nachgewiesen werden konnte, bleibt weiterhin ungeklärt, ob tatsächlich keine Metaboliten

freigesetzt wurden oder ob ein methodischer Fehler vorlag. Möglicherweise hätten sich durch die Verwendung einer anderen Säulenpackung oder durch die Untersuchung einer größeren Wassermenge mehr Substanzen anreichern bzw. nachweisen lassen. Des Weiteren könnte auch die von Walker et al. (1985) beobachtete Maskierung der UV-Absorption von Schwammsekreten durch organische Moleküle aus dem Meerwasser die Detektion von Exudaten verhindert haben. Durch Einsetzen der C18-Extrakte in biologischen Tests wäre überprüfbar, ob tatsächlich keine aktiven Substanzen angereichert wurden.

Abgesehen vom Analyseverfahren haben auch Sammelmethodik und Hälterungsbedingungen Einfluss auf die Ergebnisse. Sowohl Walker et al. (1985) als auch Dunque et al. (2001) beobachteten eine verstärkte Abgabe von Exudaten bei verletzten Schwammindividuen. Sie vermuteten, dass dadurch die Infektionsgefahr durch Mikroorganismen gesenkt wird. Die Hypothese, dass biologisch aktive Substanzen im oberflächennahen Pinacoderm angereichert und bei Verletzung nach außen abgegeben werden (Jennings & Steinberg 1997), erscheint ökonomischer und somit wahrscheinlicher als die Annahme, dass wertvolle Metaboliten zum Schutz vor Bewuchs, Weidegängern, Räubern oder Mikroorganismen exkretiert werden. Eine Lokalisierung aktiver Substanzen innerhalb des Schwammes könnte Aufschluss über die Gültigkeit dieser Hypothese geben. Eine solche Untersuchung wurde mit *P. johnstonia* durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5).

3.1.6 Inter- und intraindividuelle Unterschiede im Metabolitengehalt

Insgesamt wurden Proben (ca. 3 cm³ große Stücke) von elf *Cliona celata*-Individuen und elf Individuen von *Leucosolenia complicata* getrennt extrahiert. Während die natürliche Konzentration individuell unterschiedlich war, variierte die Zusammensetzung der Hauptmetaboliten nur unwesentlich (Tab. 3.6). Bei *L. complicata* schwankte der Metabolitengehalt innerhalb der Art stärker als bei *C. celata*. Der eingangs diskutierte Unterschied in der Substanzkonzentration war nicht mehr so groß, aber dennoch eindeutig. Für die im Jahr 2001 gesammelten *C. celata* betrug die $K_n(\text{CLCE})=37$ mg/g, während im Jahr 2003 Werte von $K_n(\text{CLCE})=33$ mg/g ermittelt wurden. Für *L. complicata* ergab sich in beiden Jahren eine Metabolitenkonzentration von $K_n(\text{LECO})=23$ mg/g.

Außerdem wurden die Schwämme *Pachymatisma johnstonia* und *Cliona celata* nach der Außen- und Innenschicht und zusätzlich, ebenso wie *Leucosolenia complicata*, nach Schwamm- und Bakterienzellen getrennt extrahiert. Die Bewertung der Metabolitenverteilung

innerhalb des Schwammkörpers erfolgte anhand der berechneten natürlichen Konzentration (Tab. 3.7).

Tabelle 3.6: Natürliche Konzentration (K_n) von Rohextrakten bezogen auf das Frischgewicht von *Leucosolenia complicata* (LECO) und *Cliona celata* (CLCE).



Extrakt	K_n [mg]	<p><i>Leucosolenia complicata</i></p>  <p><i>Cliona celata</i></p> 	Extrakt	K_n [mg]
LECO1	27,71		CLCE1	35,32
LECO2	19,54		CLCE2	40,30
LECO3	26,14		CLCE3	31,86
LECO4	25,98		CLCE4	36,97
LECO5	21,87		CLCE5	32,30
LECO6	37,05		CLCE6	31,40
LECO7	22,81		CLCE7	32,04
LECO8	25,45		CLCE8	27,80
LECO9	18,82		CLCE9	35,47
LECO10	15,20		CLCE10	31,39
LECO11	16,88		CLCE11	29,64
MW	23,40		MW	33,13
SD	6,10		SD	3,56

Tabelle 3.7: Metabolitengehalt (K_n) in Extrakten von Schwamm (S)- und Bakterienzellen (B).

Sammeldaten			Konzentration (A/I) ^{a)}		Konzentration (G) ^{b)}	
Schwamm	Vol [ml]		K_n (B) [mg/ml]	K_n (S) [mg/ml]	K_n (B) [mg/ml]	K_n (S) [mg/ml]
<i>Cliona celata</i>	300	A	50,07	176,82	7,51	26,52
		I	23,05	55,53	18,44	44,43
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	450	A	65,45	84,91	8,00	10,38
		I	36,35	61,98	24,24	41,32
<i>Leucosolenia complicata</i>	60	G	-	-	45,33	11,17

^{a)} A=Pinacoderm, I=Mesohyl

^{b)} G=Gesamt

Bei *Cliona celata* und *Pachymatisma johnstonia* befand sich der größte Teil der Substanzen in den Schwammzellen des Mesohyls. Die absolute Konzentration war jedoch im Pinacoderm höher als im Schwamminnenen. Der Bakterienzelleextrakt von *Leucosolenia complicata* enthielt viermal mehr Metaboliten als die Schwammfraktion. Bei *C. celata* machten die Bakterien 19% der Schwammbiomasse aus, bei *P. johnstonia* waren es 35%. Mit einer Bakterienbiomasse von 49% besteht *L. complicata* jeweils zur Hälfte aus Schwamm- und Bakterienzellen. Ein Vergleich

der LCMS-Ergebnisse zwischen beiden Extraktfraktionen von *Leucosolenia complicata* zeigte deutliche Unterschiede. Es wurden zwei Hauptmetaboliten-Signale ausschließlich in Schwammzellen gefunden. Zwischen den einzelnen Schwammindividuen (untersuchte Arten: *L. complicata*, *Pachymatisma johnstonia*, *Esperiopsis fucorum*) wurden keine signifikanten Unterschiede im Metabolitenprofil detektiert. Die Synthese der Metaboliten scheint von den Standortbedingungen und der assoziierten Fauna unabhängig zu sein. Im Gegensatz dazu beobachteten Swearingen & Pawlik (1998) und Schupp et al. (1999) Unterschiede im Metabolitenmuster verschiedener Populationen der Schwämme *Oceanapia* sp. und *Chondrilla nucula*. Konkurrenzbedingte Differenzen in der biologischen Aktivität von Schwämmen, wie sie Beccero et al. (1997) berichteten, konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

3.2 Biologie der untersuchten Nordseeschwämme

Im nachfolgenden Abschnitt werden die während der Forschungsfahrten mit der FS Heincke in der Umgebung der Schwämme beobachteten Organismen vorgestellt. Die Untersuchung der assoziierten Fauna sollte Hinweise auf mögliche ökologische Funktionen der Schwamm-metabolite liefern.

3.2.1 Schwammassoziierte Mikroorganismen

In allen untersuchten Schwammarten (*Esperiopsis fucorum*, *Phakellia ventilabrum*, *Leucosolenia complicata*, *Cliona celata* und *Pachymatisma johnstonia*) waren Bakterien häufig (Tab. 3.8). Mit $54,2 \times 10^5$ Zellen/cm³ enthielt *L. complicata* die höchste Bakteriendichte. Im Mesohyl von *P. johnstonia* ($37,8 \times 10^5$ Zellen/cm³) und *C. celata* ($29,9 \times 10^5$ Zellen/cm³) konnte ebenfalls eine große Anzahl der Mikroorganismen nachgewiesen werden. (Abb. 3.5). Das Pinacoderm dieser Schwämme wies Bakterienzahlen auf, die in der Größenordnung der für *E. fucorum* und *P. ventilabrum* ermittelten Bakteriendichten lagen. In Übereinstimmung mit Hentschel et al. (2002) wurden Schwämme mit einer hohen (vgl. *Rhopaloides odorabile*, *Theonella swinhoei*) und Arten mit einer niedrigeren (vgl. *Grantia compressa*, *Axinella polyplodes*) Mikroorganismendichte beobachtet.

Tabelle 3.8: Ergebnisse der Bakterienzählung.

Schwammart	Fraktion	Bakterien / Schwamm [cm ³ ~10 ml]
<i>Esperiopsis fucorum</i>	gesamt	$4,6 \times 10^5$
<i>Phakellia ventilabrum</i>	gesamt	$2,6 \times 10^5$
<i>Leucosolenia complicata</i>	gesamt	$54,2 \times 10^5$
<i>Cliona celata</i>	Pinacoderm	$2,5 \times 10^5$
<i>Cliona celata</i>	Mesohyl	$29,9 \times 10^5$
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	Pinacoderm	$6,2 \times 10^5$
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	Mesohyl	$37,8 \times 10^5$

Die Ergebnisse der direkten Bakterienzählung korrelieren gut mit der durch Extraktion erhaltenen Bakterienmasse (vgl. Kapitel 3.1.6). Bei *Pachymatisma johnstonia* betrug der Bakterienanteil 33%, während *Cliona celata* mit 16% nur etwa halb so viele Bakterien enthielt.

Bei *Leucosolenia complicata* hingegen machten Mikroorganismen die Hälfte der extrahierten Biomasse aus (49%). Mit 40% wurden für die Schwämme *Aplysina aerophoba* und *Jaspis stellifera* vergleichbare Werte ermittelt (Wilkinson 1978b; Hentschel et al. 2003). Die Bakterien-dichte soll umgekehrt proportional zur Pumpaktivität des Wasserleitungssystems sein (Hentschel et al. 2002). Demnach dürften in Schwämmen mit einem weniger gut entwickelten Wasserkanalsystem mehr Bakterien zu erwarten sein als in Arten, die einen hohen Wasserdurchsatz zeigen. Außerdem wird vermutet, dass Bakterien zur Stabilisierung des Skelettes beitragen (Hentschel et al. 2002). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Theorien. Der aus vielen einzelnen, weichen Röhren aufgebaute Kalkschwamm *L. complicata* besitzt im Gegensatz zu großen Kieselschwämmen (z.B. *Cliona celata*, *Pachymatisma johnstonia*) weniger Nadeln, kein Spongín und ein einfach gestaltetes Wasserkanalsystem. Bakterien könnten sich leichter ansiedeln und würden so dem Schwamm zu mehr Stabilität verhelfen. Den untersuchten, wesentlich robuster gebauten Kieselschwammarten würde eine hohe Bakteriendichte in dieser Hinsicht keinen Vorteil bringen. Abgesehen von diesen morphologischen Kriterien spielt sicher auch die Schwammchemie eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit der Bakterienbesiedlung. So ziehen laut Müller (1993) von Schwämmen produzierte Lectine nützliche Bakterien an, während antibiotische Substanzen das Eindringen von schädlichen Mikroorganismen verhindern sollen. Häufig unterscheidet sich die Bakterienfauna im Schwamm charakteristisch von der des umgebenden Meerwassers (Hentschel et al. 2003). Proteobakterien, Actino- und Acidobakterien sind typische schwammassoziierte Gruppen (Hentschel et al. 2003). Eigene Untersuchungen an *P. johnstonia* unterstützen diese Beobachtung (vgl. Kapitel 3.5). Der Austausch der Bakteriengruppen (Acido- gegen Actinobakterien) spricht für die von Hentschel et al. (2003) beschriebene aktive Anreicherung bestimmter Gruppen von Bakterien aus dem Meerwasser.

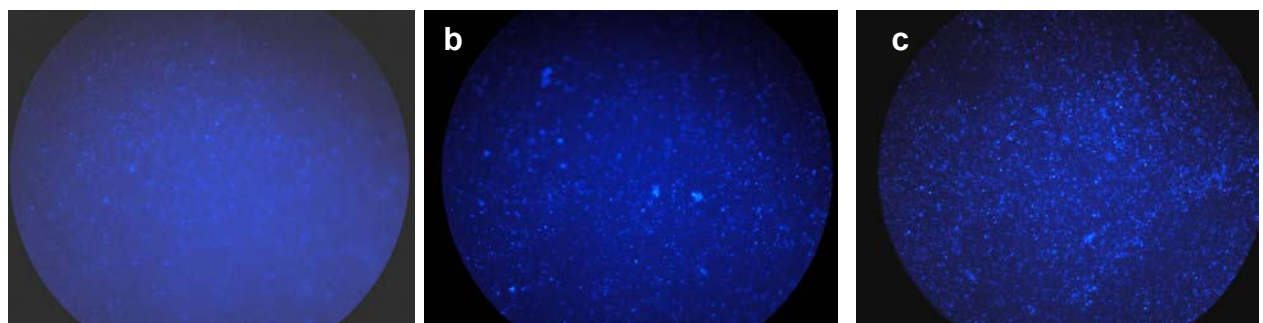


Abbildung 3.5: Mikroskopische Aufnahmen von mit DAPI angefärbten Bakterien aus dem Mesohyl von (a) *Cliona celata* [100 μ l], (b) *Esperiopsis fucorum* [100 μ l], (c) *Leucosolenia complicata* [100 μ l].

Übereinstimmend mit Wilkinson (1978) und Hentschel et al. (2003) war die gefundene Bakteriendichte im Mesohyl höher als im Pinacoderm. In der äußeren Schwammschicht wurden bisher, vor allem in karibischen Arten, photosynthetisch aktive Cyanobakterien und eukaryontische Algen nachgewiesen. Diese Mikroorganismen können als Symbionten interpretiert werden, während die im Mesohyl lebenden heterotrophen und autotrophen Bakterienarten eher als Kommensalen einzuordnen sind (Hentschel et al. 2003).

Schwämme bieten den Bakterien Schutz vor Ingestion durch andere Filtrierer, stabile Bedingungen und ein gutes Mikroklima und stellen somit einen sicheren Lebensraum dar (Garson 1994). Die Ausscheidungsprodukte des Schwammes werden vermutlich als Stickstoffquelle genutzt, was wiederum den Schwamm bei der Abgabe seiner Abfallprodukte unterstützen könnte (Hentschel et al. 2002). Auch der Besitz der antimikrobiellen Aktivität ist möglicherweise von assoziierten Mikroorganismen abhängig. Bakterien und Pilze produzieren antimikrobielle Substanzen, um andere Mikroorganismen zu verdrängen bzw. das Wachstum von Konkurrenten zu hemmen (Friedrich et al. 2001).

3.2.2 Schwammassoziierte Makroorganismen

Die untersuchten Kalkschwämme (*Leucosolenia complicata*, *Sycon ciliatum* und *Clathrina* sp.) zeigten keine Assoziation mit Invertebraten. Dies begründet sich vermutlich in ihrer Wuchsform, die keinen Raum für andere Invertebraten bietet. Zwischen den Röhren von *Leucosolenia* und *Clathrina* wurden jedoch häufig Rotalgen (*Plumaria elegans*) beobachtet. Würtz (1999) geht davon aus, dass die Schwämme bereits vorhandene Algen überwachsen. Diese überleben durch einzelne, zwischen den Schwammröhren hindurchragende Phylloide (Abb. 3.5d). Während *Sycon*-Individuen mit einer dichten Schicht aus Diatomeen überzogen waren, fehlte auf den anderen Kalkschwämmen jeglicher Bewuchs. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise auf die Wirkung von Homarin zurückführen, welches in *L. complicata* nachgewiesen wurde, nicht jedoch in *S. ciliatum* (vgl. 3.1.4). Auch bei den aus größerer Tiefe stammenden Schwammarten der Shetland-Inseln konnten keine assoziierten Makroorganismen beobachtet werden. Das bedeutet aber keinesfalls, dass diese nicht mit anderen Arten vergesellschaftet sind, sondern lässt sich eher auf die Beprobung mittels Dredge zurückführen. Klitgaard (1995) untersuchte die in mehr als 100 m Tiefe vorkommende Schwammfauna (u.a. *Phakellia* sp.) der Faroer Inseln und beschrieb eine ebenso diverse Gemeinschaft assoziierter Organismen, wie sie für die „Orkneyschwämme“ erfasst wurde (Tab. 3.9).

Auf und in den im Sublitoral der Orkneys gesammelten Kieselschwämmen hingegen ließ sich eine Vielzahl an mobilen und sessilen Invertebraten beobachten. Die an der Anheftungsfläche sitzenden Seepocken und Muscheln werden von den Schwämmen überwachsen und überleben nur dann, wenn sie über das Kanalsystem des Schwammes weiterhin Filtration betreiben können (Würtz 1999).

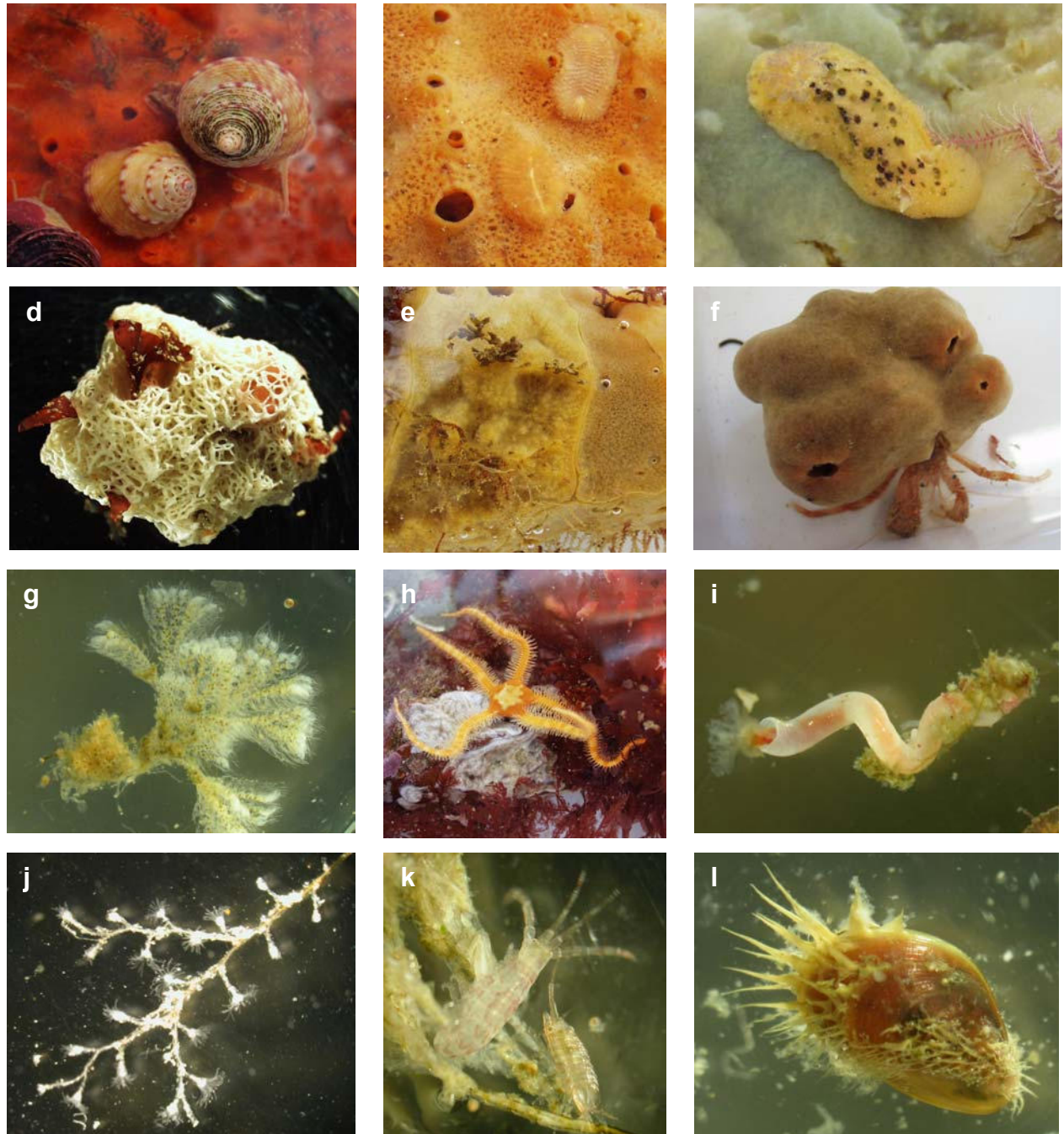


Abbildung 3.6: Interaktionen zwischen Schwämmen und anderen Organismen. (a) *Calliostoma zizyphinum* auf *Myxilla* sp., (b) *Spinther oniscoides* auf *Esperiopsis fucorum*, (c) *Archidoris pseudoargus* auf *Halichondria panicea*, (d) Rotalgen zwischen *Clathrina* sp., (e) Hydrozoa und Algen zwischen einem Mosaik aus *Myxilla*-und *Haliclona*-Schwämmen, (f) *Suberites suberia* mit Einsiedlerkreb (*Pagurus bernhardus*), (g) *Bicellariella ciliata*, (h) Ophiuroidea, (i) *Circeis spirillum*, (j) *Laomedea* sp., (k) *Parajassa pelagica*, (l) *Modiolula phaseolina*.

Tabelle 3.9: Mit den Nordseeschwämmen vergesellschaftete Invertebraten (Anzahl/Schwamm).

Schwamm	Bewuchs		Assoziierte Organismen			
	Porifera/ Hydrozoa	Bryozoa/ andere	Crustacea	Polychaeta	Mollusca	Echinodermata/ andere
<i>S. suberia</i>	-	-	<i>Pagurus bernhardus</i> (1)	-	-	-
<i>P. johnstonia</i>	<i>Clathrina</i> sp.(1), <i>Leucosolenia complicata</i> (1) / <i>Laomedea</i> sp. (3), <i>Obelia</i> sp. (2)	<i>Bicelliarella ciliata</i> , <i>Scrupocellaria scruposa</i> , <i>Crisia</i> sp., <i>Callopora lineata</i> , <i>Crisia aculeata</i> (Hauptbewuchs) / -	Amphipoda, Isopoda, <i>Caprella</i> sp. (je 2)	<i>Typosyllis armillaris</i> (6)	<i>Modiolula phaseolina</i> (19), <i>Hiatella arctica</i> , <i>Glycymeris glycymeris</i> , <i>Musculus</i> sp. (je 1)	- / Plathelminthes (1), Nematoda (6), <i>Gelidium latifolium</i> (3)
<i>E. fucorum</i>	<i>Leucosolenia complicata</i> (2) / <i>Tubularia indivisa</i> (18), <i>Halecium</i> sp. (4)	<i>Diphasia rosacea</i> (1), <i>Crisia eburnea</i> (4), <i>Abietinaria abietina</i> (5) / -	<i>Caprella linearis</i> (10), <i>Parajassa pelagica</i> (12)	<i>Typosyllis armillaris</i> (2), <i>Typosyllis gracilis</i> (3), <i>Pomatoceros triqueter</i> (1), <i>Circeis spirillum</i> (2), <i>Spinther oniscoides</i> (6)	<i>Musculus</i> sp. juv. (1), <i>Calliostoma zephyrinum</i> (2)	<i>Ophiothrix fragilis</i> (1) / <i>Plocamium cartilagineum</i> (Hauptbewuchs), Nematoda (10), Plathelminthes (1)
<i>M. incrustans</i>	- / <i>Corynactis viridis</i> (1), <i>Obelia</i> sp. (1), <i>Laomedea</i> sp. (1)	-	-	-	-	-
<i>M. fimbriata</i> & <i>M. rosea</i>	-	-	-	-	<i>Calliostoma zephyrinum</i> (1)	<i>Ophiothrix fragilis</i> (1) / -
<i>C. celata</i>	-	-	-	-	-	<i>Ophiothrix fragilis</i> (15) / -
<i>I. palmata</i>	-	-	-	-	<i>Rostanga rubra</i> (1)	<i>Ophiothrix fragilis</i> (10), <i>Ophiopholis aculeata</i> (3) / -
<i>H. panicea</i>	-	-	-	-	<i>Archidoris pseudoargus</i> (1)	<i>Asterias rubens</i> (1), <i>Henricia sanguinolenta</i> (1) / -
<i>H. cinerea</i>	-	- / <i>Balanus balanoides</i> (4), <i>Anemonia ephippium</i> (2)	-	-	<i>Jorunna tumentosa</i> (1)	<i>Ophiothrix fragilis</i> (in allen Kanälen) / -
<i>H. rosea</i>	-	-	-	-	<i>Calliostoma zephyrinum</i> (1)	<i>Ophiothrix fragilis</i> (1) / -

Eine von Bryozoen und Hydrozoen dominierte Epifauna war nur bei einzelnen *Pachymatisma johnstonia*- und *Esperiopsis fucorum*-Individuen besonders stark ausgebildet (Tab. 3.9 und Abb. 3.6). Warum andere Individuen und Arten ähnlicher Wuchsform (z.B. *Cliona celata*, *Haliclona* sp.) frei von Epibionten sind, blieb bisher unerforscht. Laut Dyrinda (1985) wird eine schädliche Besiedlung mit Mikro- und Makroorganismen (Invertebraten, Einzeller, Bakterien, Pilze, Mikro- und Makroalgen) dann beobachtet, wenn die Abwehrmechanismen der Schwämme gestört sind (vgl. Kapitel 5.3.2).

In vielen massiv wachsenden Arten waren Ophiuroiden häufig anzutreffen (Abb. 3.6h). Sowohl juvenile, als auch ausgewachsene Schlangensterne saßen in Schwämmen, die ausreichend große Poren und Wasserkanäle ausbildeten. *Pachymatisma johnstonia* besitzt vergleichsweise enge Kanäle und ist deshalb frei von Schlangensteinen (Tab. 3.9). Auf *Isodictya palmata*, *Halichondria panicea* und *Haliclona cinerea* wurden räuberische Nacktschnecken entdeckt (Abb. 3.6c). Seesterne hielten sich auf den „Orkneyschwämmen“ selbst oder in deren unmittelbarer Nähe ebenso auf, wie die von Würtz (1999) für *H. panicea* beschriebenen kommensalischen Crustaceen (Abb. 3.6k). Die in *P. johnstonia* und *E. fucorum* beobachteten Polychaeten der Gattung *Typosyllis* sind vermutlich als räuberisch einzustufen, da Pawlik (1983) und Klitgaard (1995) verwandte Arten (*Haplosyllis spongicola*, *Branchiosyllis oculata*) eindeutig als spongivor identifizierten. Ob die prosobranche Schnecke *Calliostoma zizyphinum* ebenfalls zu den Schwammprädatoren gezählt werden muss, oder ob sie nur den Bewuchs der Schwämme abweidet, ist nicht bekannt (Abb. 3.6a).

Tabelle 3.10: Vergleich der bekannten schwammassoziierten Fauna kaltgemäßigter Habitate.

Assoziierte Taxa	Anteil an assoziierter Fauna [%]			Maximale Häufigkeiten		
	Orkney- Schwämme Zanker (2004)	<i>Halichondria panicea</i> Würtz (1999)	Faroer- Schwämme Klitgaard (1995)	Orkney- Schwämme Zanker (2004)	<i>Halichondria panicea</i> Würtz (1999)	Faroer- Schwämme Klitgaard (1995)
Porifera	4	0	1	25	0	90
Hydrozoa	13	3	6	38	20	90
Bryozoa	21	1	13	25	17	90
Crustacea	10	50	12	38	80	73
Polychaeta	21	5	26	25	50	100
Mollusca	21	1	5	88	5	73
Nematoda	2	28	11	25	100	73
Echinodermata	8	1	7	75	2	100
Ascidiacea	0	2	5	0	5	45
andere	0	29	14	0	kA ^{a)}	kA ^{a)}

^{a)} keine Angaben

Neves & Omena (2003) beschrieben Amphipoda, Ophiuroidea und Polychaeta als die dominierenden Gruppen unter den schwammassoziierten Organismen brasilianischer Schwämme. Auch bei den Nordsee- bzw. Nordatlantischschwämmen zählen diese Taxa zu den häufigsten Bewohnern (Tab. 3.10). Würtz (1999) untersuchte 25 *Halichondria panicea*-Individuen vor Helgoland und beobachtete, dass 68% der Tiere mit Bryozoa, 80% mit Amphipoda, 76% mit Rhodophyta und 100% mit Nematoda vergesellschaftet waren. Insgesamt

stellte er eine ebenso diverse Fauna fest wie Klitgaard (1995) für Tiefwasserschwämme und wie hier für *Pachymatisma johnstonia* und *E. fucorum* beschrieben. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Würtz (1999) waren die *Halichondria*-Individuen der Orkney-Inseln weniger stark mit Epi- und Endobionten besiedelt (Tab. 3.10). Entweder war die Anzahl der untersuchten Proben (n=7) nicht repräsentativ genug, oder die Assoziationen variieren je nach Standort und Individuum.

Bedingt durch ihre Morphologie bieten Schwämme vielerlei Ansiedlungsmöglichkeiten für die in der Umgebung lebende Makro- und Mikrofauna. Bereits 1932 beschrieb Pearse Kiesel-schwämme als lebende Herbergen. Unter den Bewohnern der Schwammoberfläche, der Oscula und des Wasserkanalsystemes findet man Vertreter aller benthischen Invertebratentaxa. Dies veranlasste Bacescu (1971) zu der Aussage, dass Schwämme neben tropischen Korallenriffen eines der reichhaltigsten und interessantesten Biotope darstellen. Betrachtet man die Liste der assoziierten Organismen, kann man dem nur zustimmen. Bisher ungeklärt ist, welche schädlichen oder nützlichen Effekte die assoziierte Fauna auf das Leben der Schwämme hat. Eine Beeinträchtigung der Individuen durch Giftstoffe, die von assoziierten Organismen produziert werden, oder das Zusetzen von Oscula und Wasserkanälen und damit eine Behinderung von Nahrungsaufnahme und Exkretion ist nicht auszuschließen.

Neben den oben beschriebenen Assoziationen wurden weitere intra- und interphyletische Interaktionen, wie teilweise bereits unter 1.2.2 beschrieben, beobachtet. Unmittelbar neben Schwämmen siedelten Ascidiacea, Bryozoa, Hydrozoa und andere Schwammarten, was einen hohen Konkurrenzdruck vermuten lässt (Dyrynda 1985). Vor allem langsam wachsende, krustenbildende Schwämme, die Bestandteil langlebiger Biozönosen sind und eine große Fläche einnehmen, scheinen sich wirksam vor dem Überwachsenwerden durch andere Arten zu schützen (Abb. 3.7).

Bell & Barnes (2003) dokumentierten in der Irischen See insgesamt 7816 Interaktionen zwischen 39 Schwammarten und ihrer biotischen Umwelt. 27% davon waren intraphyletische, also Schwamm-Schwamm Interaktionen. Unter den untersuchten Arten (u.a. *Leucosolenia complicata*, *Clathrina coriacea*, *Haliclona rosea*, *H. cinerea*, *Myxilla fimbriata*, *M. rosacea*, *Esperiopsis fucorum*, *Pachymatisma johnstonia*, *Cliona celata*) waren *L. complicata*, *H. cinerea* und *H. rosea* am konkurrenzstärksten. In 69% des Aufeinandertreffens mit anderen Organismen bildeten Schwämme stabile Grenzen aus und nur selten schaffte es eine Art, die andere zu überwachsen. An den restlichen Interaktionen waren Bivalvia, Ascidiacea, Cnidaria, Polychaeta, Cirripedia und Bryozoa beteiligt. In nur 6% dieser Interaktionen wurden die Schwämme von

Konkurrenten überwachsen. Es wird vermutet, dass neben der Substratbeschaffenheit auch die Morphologie der Schwämme bei der Beurteilung von Interaktionen berücksichtigt werden muss. Dickere, krustenförmige Arten (> 2 mm) überwachsen dünnere (< 1 mm). Des Weiteren ist die in Kapitel 1.1 erläuterte Ausbreitung des Gewebes im Sommer bzw. dessen Rückzug im Winter von Bedeutung (Bell & Barnes 2003). Derartig detaillierte ökologische Studien liegen für die Gebiete der Orkney- und Shetland-Inseln nicht vor, die Mechanismen dürften aber vergleichbar sein.

Über die Art der Abwehr- oder Schutzmechanismen, welche die einzelnen Organismen im Laufe ihrer Evolution hervorgebracht haben, wird bisher nur spekuliert. Obwohl experimentelle Nachweise im Freiland fehlen, ist sicher, dass Naturstoffen eine bedeutende Rolle bei vielen Interaktionen zukommt. Grossberg (1991) beobachtete beispielsweise, dass Larven sessiler Invertebraten dicht mit *Botryllus schlosseri* (Ascidacea) bewachsene Substrate meiden und vermutete eine chemische Abwehr.

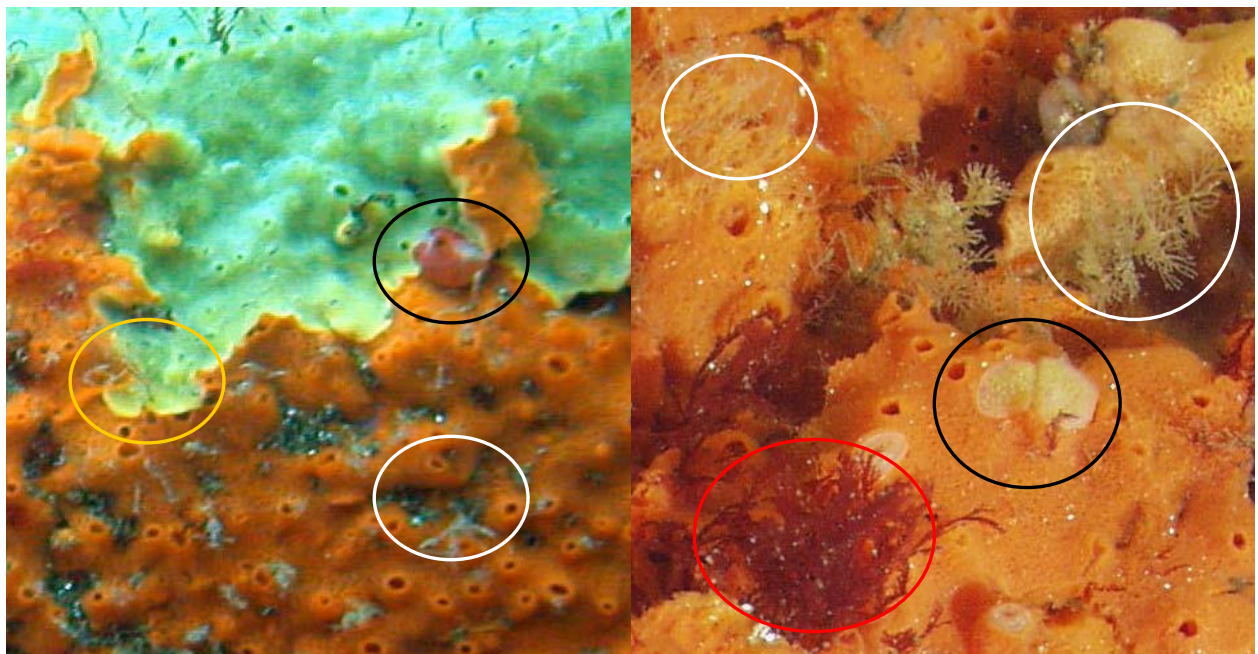


Abbildung 3.7: Intra- und interphyletische Interaktionen auf Felssubstrat (Orkney-Inseln). Markierte Interaktionen: Porifera-Porifera (gelb), Porifera-Ascidacea (schwarz), Porifera-Hydrozoa (weiß), Porifera-Rhodophyta (rot).

3.3 Biologische Aktivität der Nordseeschwämme

In verschiedenen Tests wurde die biologische Aktivität der Metaboliten von 17 Nordseeschwammarten untersucht. Die Ergebnisse der Versuche zur antilarvalen, antimikrobiellen, enzyminhibitorischen und toxischen Wirkung lieferten Hinweise auf mögliche ökologische Funktionen der Sekundärmetaboliten und gaben Aufschluss über ihr pharmakologisches Potential.

3.3.1 Antilarvale Aktivität

Nachfolgend sind die Resultate der mit Invertebratenlarven durchgeführten Toxizitätstests angeführt. Eine letale Wirkung der Schwammextrakte gegenüber Larven von Konkurrenzarten lässt Rückschlüsse auf mögliche *Antifouling*-Wirkung zu, und erlaubt die Bestimmung der allgemeinen Toxizität.

3.3.1.1 Toxizität gegenüber Larven von *Halichondria panicea* (Porifera)

Nach einer Inkubationszeit von 24 h hatten sich insgesamt 2% der Larven festgesetzt. Die Larvensterblichkeit in der Kontrolllösung betrug 1%. Es waren keine Larven zu beobachten, die bereits mit der Metamorphose begonnen hatten.

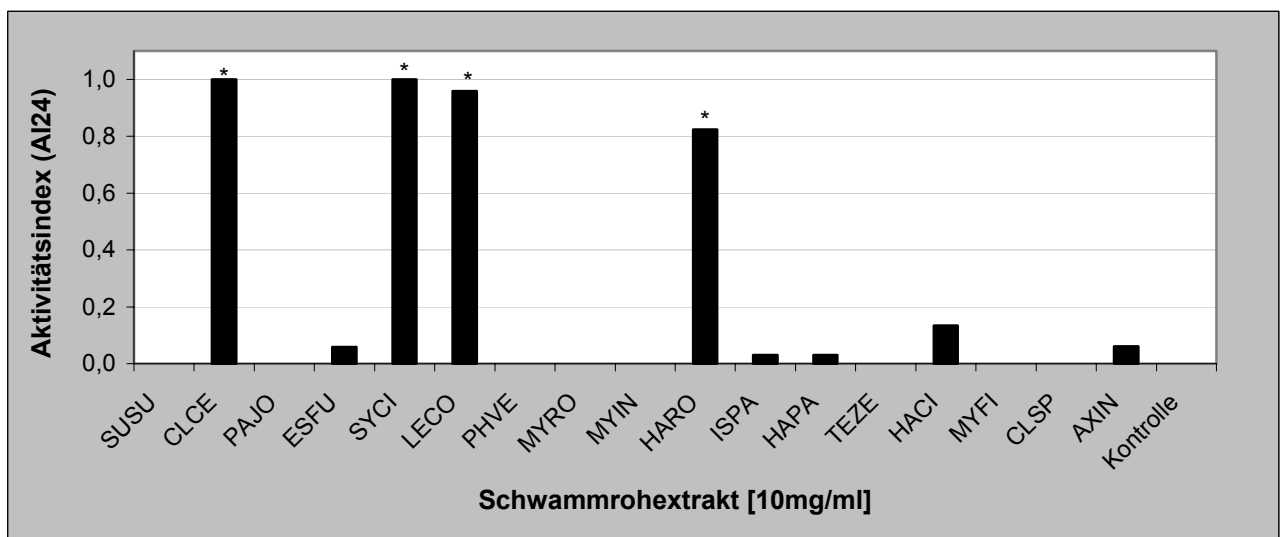


Abbildung 3.8: Toxizität der Dichlormethan/Methanolextrakte gegenüber Schwammlarven. Signifikante biologische Aktivität ist mit * gekennzeichnet (t-Test, $\alpha=1\%$). Abkürzung der Schwammnamen wie in Tab. 2.1 (S. 23) aufgelistet.

Die Rohextrakte von *Cliona celata*, *Sycon ciliatum*, *Leucosolenia complicata* sowie *Haliclona rosea* zeigten signifikante Toxizität gegenüber den Schwammlarven. Nach einer Versuchsdauer von 24 h wurde eine Mortalitätsrate von 82% bis 100% beobachtet (Abb. 3.8). Alle anderen Extrakte beeinflussten das Verhalten der Schwammlarven nicht oder nur minimal.

3.3.1.2 Toxizität gegenüber Larven von *Polyclinum aurantium* (Ascidacea)

Da die Metamorphosestadien der Ascidienlarven schwer zu unterscheiden waren, eigneten sie sich im Vergleich zu den anderen untersuchten Arten schlechter zur Durchführung dieses Biotests. Nach 48 h konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Kontrolllarven und den noch lebenden Testtieren festgestellt werden. Daher wurden nur die Ergebnisse nach 24-stündiger Inkubation ausgewertet. Mit einem Aktivitätsindex $AI_{24}=1$ wirkten die Dichlormethan/Methanolextrakte von *Cliona celata*, *Leucosolenia complicata*, *Myxilla rosacea*, *Isodictya palmata*, *Halichondria panicea* und *Tetilla zetlandica* signifikant toxisch (Abb. 3.9). Sowohl *Suberites suberia* ($AI_{24}=0,49$) als auch *Myxilla incrustans* ($AI_{24}=0,55$) zeigten schwache Toxizität. Alle anderen Schwammextrakte riefen keine beobachtbaren, schädlichen Effekte hervor. Verglichen mit den Kontrolltieren beschleunigte der *Clathrina*-Extrakt die Metamorphose der Ascidienlarven. Innerhalb der Beobachtungszeit befanden sich signifikant mehr Larven in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium (t-Test, $\alpha=1\%$).

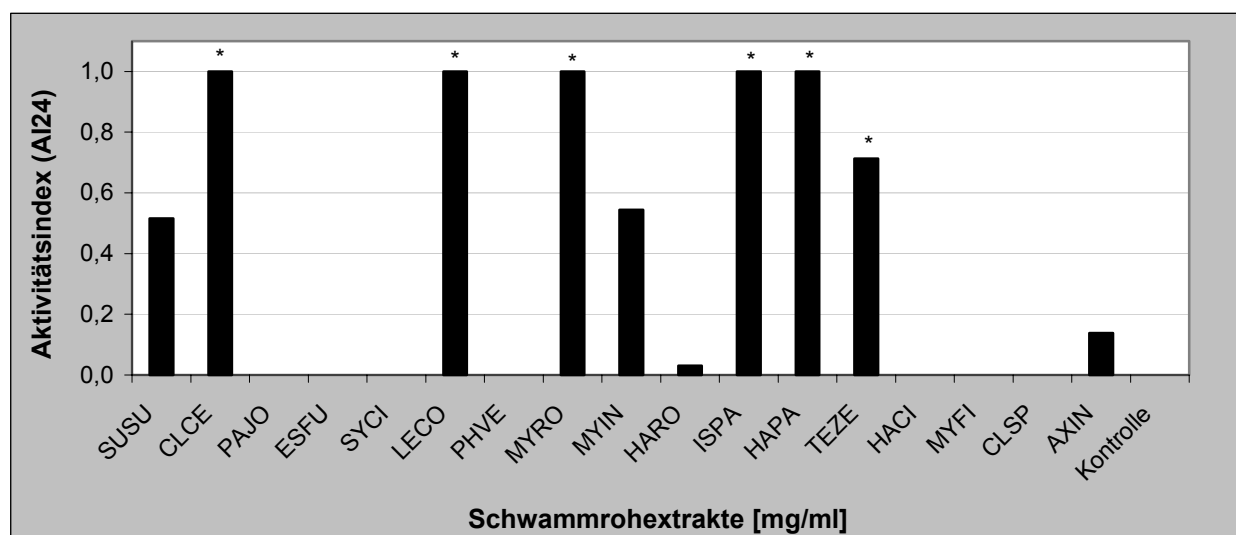


Abbildung 3.9: Toxizität der Dichlormethan/Methanolextrakte gegenüber Ascidienlarven. Signifikante biologische Aktivität ist mit * gekennzeichnet (t-Test, $\alpha=1\%$). Abkürzung der Schwammnamen wie in Tab. 2.1 (S. 23) aufgelistet.

3.3.1.3 Toxizität gegenüber Crustaceen-Larven

Larven von *Carcinus maenas*

Phakellia ventilabrum zeigte gegenüber den *Carcinus maenas*-Larven die größte Toxizität. Bereits nach 24 h betrug die Mortalität über 90%. Nach 48-stündiger Inkubation war die Larvensterblichkeit auf alle Extrakte bezogen höher. Signifikante toxische Effekte wurden zusätzlich zu *Phakellia ventilabrum* auch durch *Cliona celata*- und *Esperiopsis fucorum*-Extrakte ausgelöst (Abb. 3.10). Larven in der Kontrolllösung überlebten zu 100%.

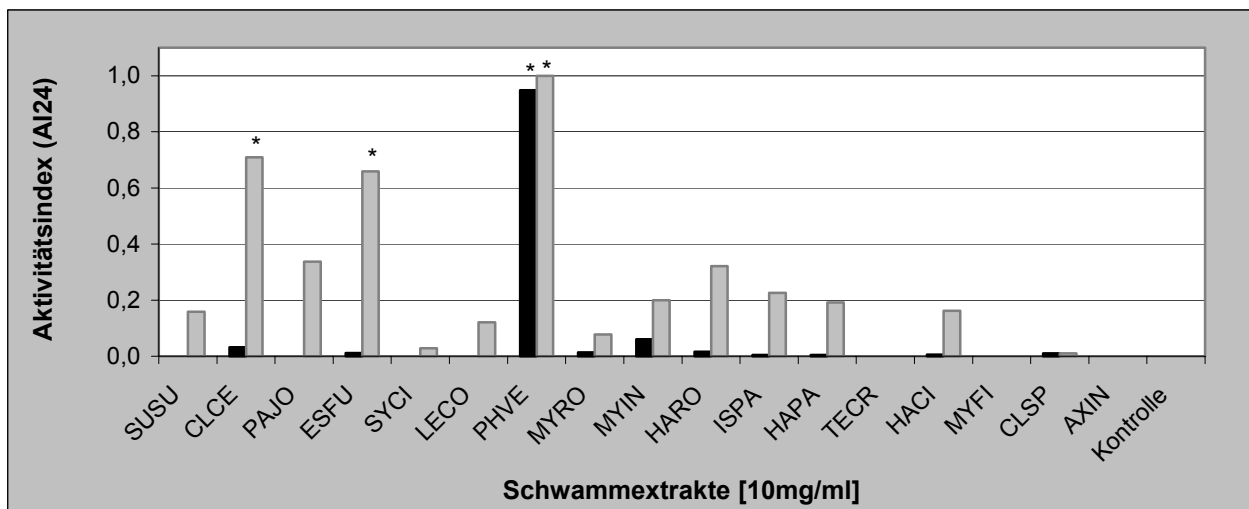


Abbildung 3.10: Toxizität der Dichlormethan/Methanolextrakte gegenüber *Carcinus maenas*-Larven nach 24 h (schwarz) und 48 h (grau) Inkubation. Signifikante biologische Aktivität ist mit * gekennzeichnet (t-Test, $\alpha=1\%$). Abkürzung der Schwammnamen wie in Tab. 2.1 (S. 23) aufgelistet.

Larven von *Artemia salina*

Extrakte von *Phakellia ventilabrum*, *Leucosolenia complicata*, *Pachymatisma johnstonia* und *Haliclona rosea* wirkten gegenüber *Artemia salina* toxisch. Nach 24 h waren über 70% der Larven tot. Nach 48-stündiger Inkubation verursachten auch die Extrakte von *Suberites suberia*, *Sycon ciliatum* und *Halichondria panicea* signifikante Mortalität. Die aktiven Substanzen verteilten sich auf die Hexan- und Essigesterfraktion von *S. suberia*, *S. ciliatum* und *L. complicata* sowie die Essigesterphase von *H. panicea*. Die Butanol- und Wasserphasen waren erst nach 48 h aktiv (*P. johnstonia*, *S. ciliatum*, *P. ventilabrum*) oder blieben wirkungslos (Tab. 3.11). Extrakte aus *P. ventilabrum* waren noch bei einer Konzentration von 5 mg signifikant aktiv. Die bereits beschriebene Abhängigkeit der Toxizität von der Inkubationszeit war in diesem Versuch ebenso nachweisbar, wie die Abhängigkeit der Mortalitätsrate von der eingesetzten

Extraktkonzentration (Tab. 3.11 und Abb. 3.11). So wirkte zum Beispiel der Extrakt von *Sycon ciliatum* erst nach 48 h und nur in einer Konzentration von 50 bzw. 20 mg toxisch.

Tabelle 3.11: Konzentrationsabhängigkeit der Toxizität der Schwammrohextrakte im *brine-shrimp*-assay mit Larven des Salinenkrebsschens *Artemia salina*.

Schwamm	50 [mg/ml]		20 [mg/ml]		10 [mg/ml]		5 [mg/ml]	
	24h	48h	2	48h	2	48h	2	48h
<i>Suberites suberia</i>	37	76	26	51	28	58	0	2
<i>Cliona celata</i>	10	38	13	38	5	6	2	2
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	76	100	47	100	32	96	0	11
<i>Esperiopsis fucorum</i>	16	24	10	10	2	4	0	3
<i>Sycon ciliatum</i>	49	100	21	100	2	8	0	3
<i>Leucosolenia complicata</i>	100	100	62	100	12	86	4	4
<i>Phakellia ventilabrum</i>	97	100	91	100	31	92	7	76
<i>Myxilla rosacea</i>	9	9	0	15	3	23	0	0
<i>Myxilla incrustans</i>	12	12	0	0	0	0	0	0
<i>Isodictya palmata</i>	83	93	4	25	7	24	4	23
<i>Halichondria panicea</i>	36	43	7	7	0	7	0	0
<i>Haliclona cinerea</i>	36	93	7	66	0	63	0	5
<i>Myxilla fimbriata</i>	0	1	2	3	4	4	0	0
<i>Haliclona rosea</i>	5	14	2	2	0	2	0	0
<i>Tetilla zetlandica</i>	0	25	0	15	3	16	0	3
<i>Clathrina</i> sp.	0	2	0	7	6	6	2	2
<i>Axinella infundibuliformis</i>	0	2	0	0	0	10	0	0

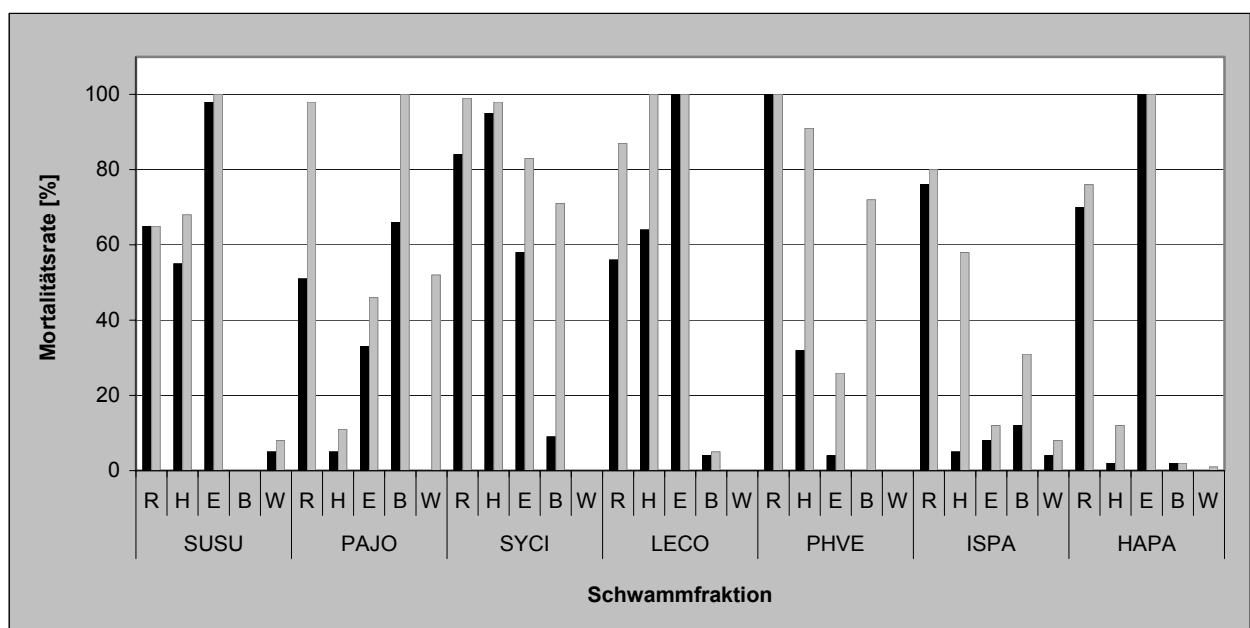


Abbildung 3.11: Toxizität der Extraktfraktionen in einer Konzentration von 50 mg/ml gegenüber Larven von *Artemia salina*. Mortalitätsrate [%] nach 24 h (schwarz) bzw. 48 h (grau). Abkürzung der Schwammnamen wie in Tab. 2.1 (S. 23) aufgelistet (R=Rohextrakt, H=Hexan-, E=Ethylacetat-, B=Butanol-, W=Wasserfraktion).

3.3.1.4 Zusammenfassung der Larventoxizität

Mit der hier angewandten Methode konnte für 65% der Schwammarten eine Larventoxizität nachgewiesen werden. Die Vitalität der *Carcinus maenas*- und *Artemia salina*-Larven wurde weniger stark von den Schwammextrakten (10 mg/ml) beeinflusst, als dies für die *Polyclinum aurantium*- und *Halichondria panicea*-Larven zu beobachten war. Nur der aus *Phakellia ventilabrum* gewonnene Extrakt zeigte signifikante Aktivität gegenüber *Carcinus maenas*-Larven (Abb. 3.12). Nach 24-stündiger Inkubation wirkten Extrakte von *Cliona celata* und *Leucosolenia complicata* sowohl gegen Ascidien- als auch gegen Schwammlarven zu 100% letal. Während sich die Toxizität von *Sycon ciliatum* und *Haliclona rosea* auf Schwammlarven beschränkte, verursachten Extrakte von *Myxilla rosacea*, *Halichondria panicea*, *Isodictya palmata* und *Tetilla zetlandica* eine hohe Sterblichkeit der Ascidienlarven.

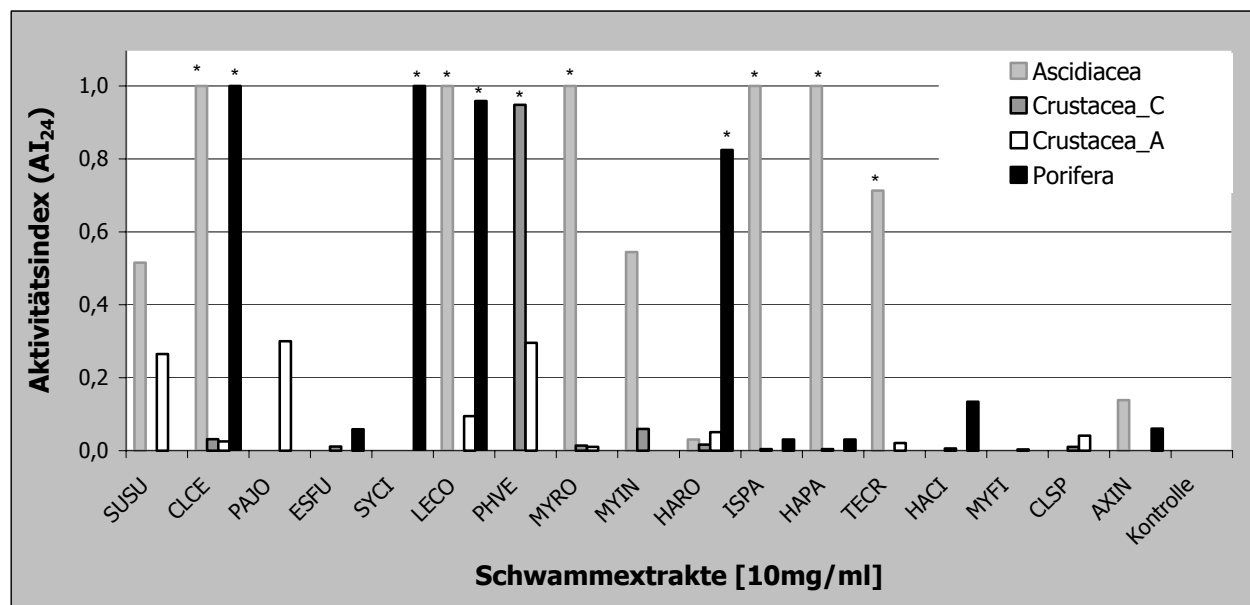


Abbildung 3.12: Vergleich der Ergebnisse aller antilarvalen Biotests. Crustacea_C: *Carcinus maenas*; Crustacea_A: *Artemia salina*. Signifikante Wirkung ist mit * gekennzeichnet (t-Test, $\alpha=1\%$). Abkürzung der Schwammnamen wie in Tab. 2.1 (S. 23) aufgelistet.

Die meisten marinen benthischen Invertebraten haben planktische Larvenstadien zur Fortpflanzung und Verbreitung entwickelt. Das Überleben der Larven ist eng an das Auffinden eines geeigneten Substrates gebunden (Crisp 1974), und wird durch eine Vielzahl weiterer abiotischer (Hydrodynamik, Salinität, Temperatur, Licht) und biotischer (Alter und Ernährungszustand der Larven, Konkurrenten, Prädatoren) Faktoren beeinflusst. Beispielsweise induzieren von Artgenossen, Feinden und mikrobiellen Biofilmen abgegebene chemische Signale das Festsetzen oder die Metamorphose von Invertebratenlarven (Pawlik 1992). So vielfältig die

Faktoren sind, die bei der Larvalentwicklung eine Rolle spielen, so unterschiedlich sind auch die Ansatzmöglichkeiten der Sekundärmetaboliten zur Störung des Prozesses. Cytotoxische, enzyminhibitorische und antimikrobielle Effekte können involviert sein. Da die toxische Wirkung der Extrakte gegenüber den Ascidien- und Porifera-Larven eindeutig stärker war als gegen die Crustaceen-Larven, ist anzunehmen, dass die Krebslarven entweder widerstandsfähiger sind, oder die Toxizität der Schwämme spezifisch an die Abwehr potentieller Konkurrenten angepasst ist. Die starke Aktivität von *Cliona celata*, *Sycon ciliatum* und *Leucosolenia complicata* gegenüber *Halichondria panicea* ermöglicht vermutlich die Sicherung von Siedlungsfläche und impliziert somit eine ökologische Funktion der Toxizität.

Die chemische Natur der wirksamen Substanzen scheint divers zu sein, da sowohl polare als auch unpolare Schwammextrakte Aktivität zeigten bzw. nicht alle Larvenarten von den gleichen Extrakten geschädigt wurden. Der Schwamm *Mycale adherens* verhindert das Festsetzen von Larven des Hydroidpolypen *Hydroides elegans* durch die Exkretion wasserlöslicher Substanzen (Lee & Qian 2003). Sowohl polare als auch unpolare Substanzen hemmen laut Tsukamoto et al. (1999) die Ansiedlung von Seepocken- (*Balanus amphitrite*) oder Muschellarven (*Mytilus edulis*). Als Reinsubstanzen mit antilarvaler Funktion wurden bisher neben Homarin, Trigonellin und Betain auch unpolare, nahe der Schwammoberfläche gebundene Terpenoide, Ceratinamine und Ceratinamide identifiziert (Berking 1987; Miki et al. 1997; Tomono et al. 1998; Sera et al. 1999).

3.3.2 Antifouling-Wirkung

Wie bereits angesprochen, stellt die Entwicklung und Durchführung ökologisch relevanter Biotests eine Herausforderung dar. Mit der Abwandlung des Phytagelversuchs (Henrikson & Pawlik 1995) sollte eine für Nordseeverhältnisse geeignete Testmethode zur Ermittlung der natürlichen Antifouling-Wirkung von Sekundärmetaboliten entwickelt werden. Die eigens für diesen Versuch konzipierten PVC-Platten waren sowohl über als auch unter Wasser gut handhabbar. Das Phytagel blieb über die gesamte Versuchsdauer stabil. Insgesamt hat sich der Versuchsaufbau demnach bewährt (Abb. 3.14). Bei der Deutung der Ergebnisse müssen jedoch verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, auf die in der nachfolgenden Diskussion im Speziellen eingegangen wird. Durch den Einsatz von Phytagel als Matrix für die Extrakte werden die natürlichen Bedingungen, wie sie ein Schwamm bietet, nicht in allen Bereichen zu hundert Prozent imitiert, so dass ökologische Rückschlüsse nur begrenzt möglich sind.

Zur Überprüfung der Substanzdiffusion wurden in Intervallen von drei oder sechs Tagen Kontrollgele aus der Versuchsanordnung entnommen, extrahiert und mittels HPLC analysiert. Alle Chromatogramme zeigten ein ähnliches Muster (Abb. 3.13). Während Henrikson & Pawlik (1995) nach 21 Tagen noch 56% der eingesetzten Substanzmenge im Gel wieder fanden, war die Konzentrationsabnahme in den hier untersuchten Kontrollgelen nicht quantifizierbar. Tendenziell nahm die Konzentration leicht ab.

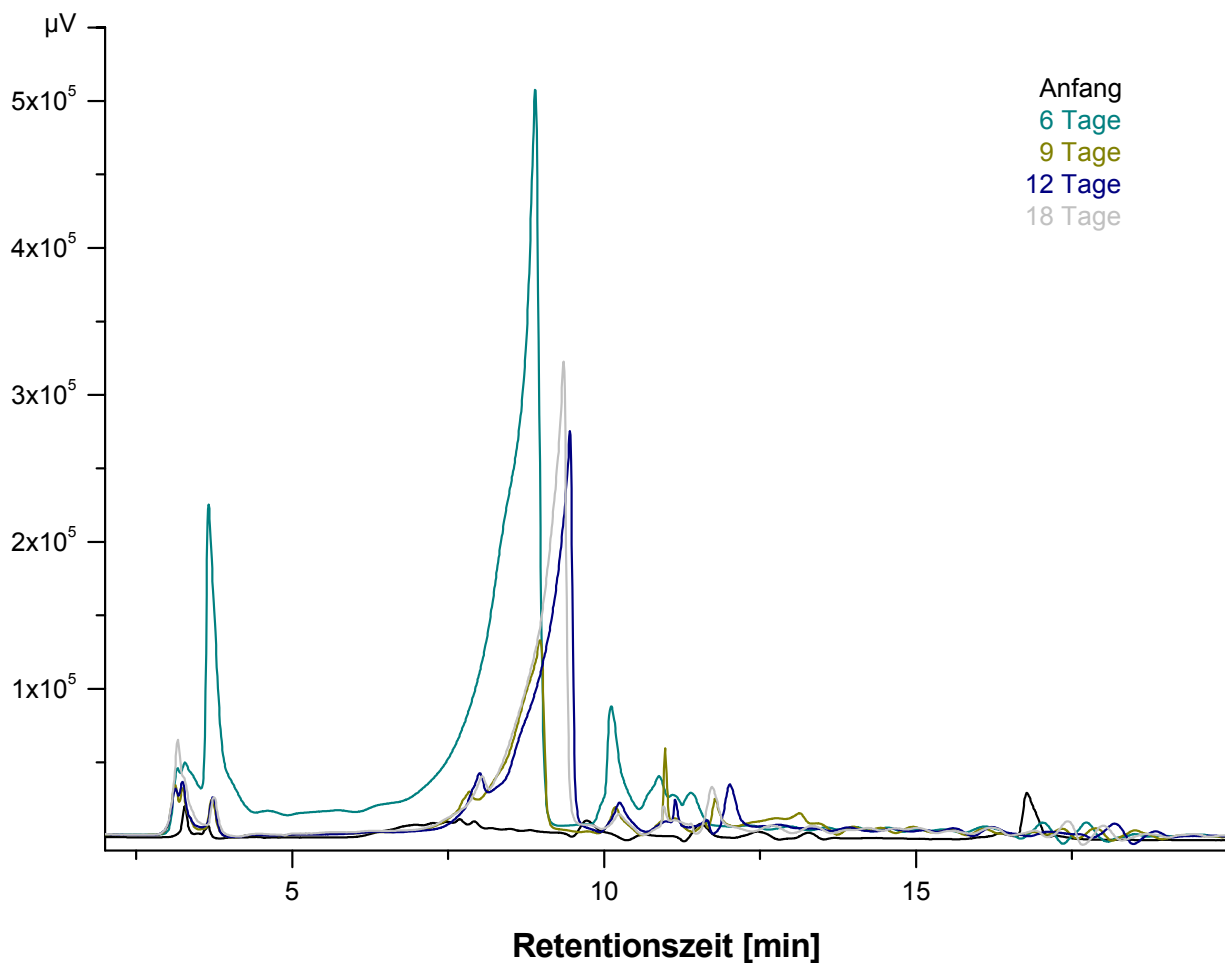


Abbildung 3.13: Ergebnisse der Kontrollversuche zur Diffusion der Extrakte. (Säule: Diol-Kromasil-RP18 (4,6 x 250 mm, 7 µm), Gradient: 100% ACN für 25 min, 50% H₂O/ACN 30 min, 50% MeOH/H₂O 40 min, 100% MeOH 45 min, Flußrate: 1 ml/min).

Auf den Phytagelen beider Versuchsreihen war nach Ablauf der Inkubationszeit ein Bewuchs aus fädigen Grünalgen (*Acrosiphonia* sp.) sichtbar (Abb. 3.14). Außerdem wurden *Fouling*-Organismen wie Crustacea (*Semibalanus balanoides*), Hydrozoa (*Obelia* sp.) und Bivalvia (*Mytilus edulis*, *Ostrea* sp.) sowie mobile Invertebraten (Gastropoda, Amphipoda, Copepoda, Acari, Nemertini, Polychaeta, Turbellaria) beobachtet. Die Schnecke *Lacuna pallidula* sowie die vorkommenden Amphipoda und Copepoda werden nachfolgend als Weidegänger (*Grazer*)

klassifiziert. Eine genaue Aufstellung der assoziierten Fauna kann im Anhang auf den Seiten 197 und 198 eingesehen werden.

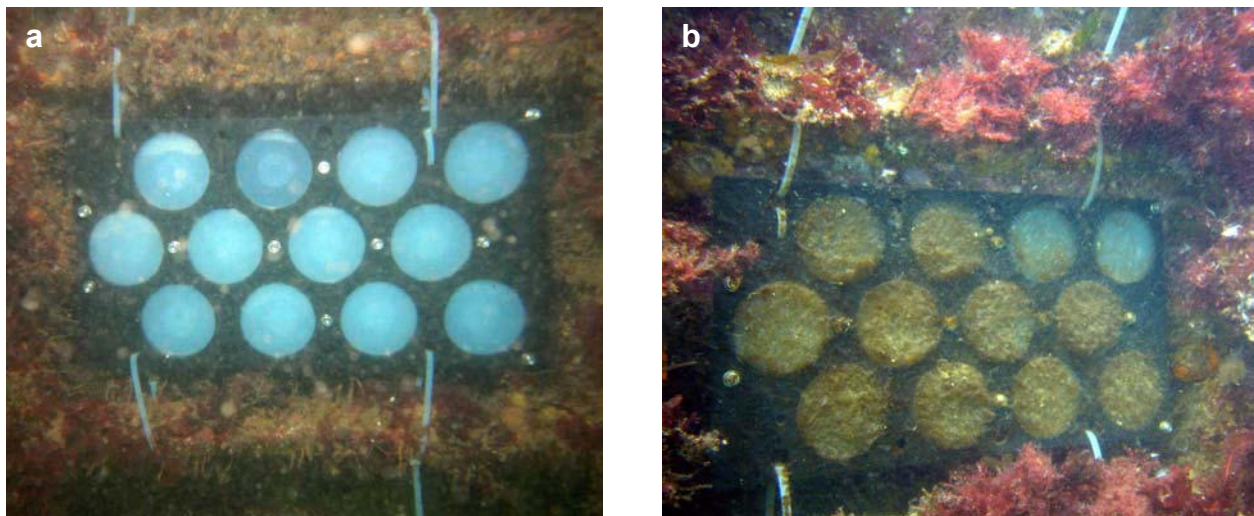


Abbildung 3.14: *Antifouling*-Versuchsplatten, (a) frisch ausgebracht, (b) nach 36-tägiger Inkubation.

Nach der Erfassung der Algendichte und der Biomassebestimmung ergaben sich für den Versuch der ersten Testreihe (36-tägige Inkubation) verschiedene Bewuchsklassen (Tab. 3.12a). Für die Kontrollgele wurde eine Algendichte von drei ermittelt. Auf den mit Reinsubstanzen versetzten Gelen zeigte sich mit einer Dichte von vier das stärkste Algenwachstum. Signifikant weniger Algenbewuchs war auf den *Pachymatisma johnstonia*-Gelen sowie auf dem *Myxilla fimbriata*-Gel zu beobachten. Auf diesen Gelen und zusätzlich bei *Isodictya palmata* wurden signifikant weniger Grazer gezählt als auf den Kontrollen (Tab. 3.12a). Der Algenbewuchs korrelierte demnach direkt mit der Anzahl der *Grazer*. Mit durchschnittlich 1,5 Tieren/Gel waren die Proben, abgesehen vom Rohextrakt aus *Leucosolenia complicata* (6 Tiere/Gel), wenig mit Invertebraten besiedelt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass die Inkubationsdauer insgesamt zu lange war, und der starke Algenbewuchs mit der Zeit zu einer Verdrängung anderer *Fouling*-Organismen führte. Die erste Testreihe lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse bezüglich der *Antifouling*-Wirkung. Daher wurde der Versuch mit kürzerer Inkubationsdauer wiederholt.

Die Auswertung der zweiten Testreihe erfolgte nach 18-tägiger Inkubation. Im Verlaufe des Versuchs wurden die Platten nach sechs, neun, zwölf und 18 Tagen kontrolliert, um den Fortgang der Besiedlung zu beobachten. Auf den Gelen der zweiten Testreihe war die Algendichte insgesamt geringer, die Anzahl an Aufwuchsorganismen deutlich, die Anzahl der *Grazer* geringfügig höher (Tab. 3.12b) als im ersten Ansatz. Unter den Epibionten dominierten

Seepocken. Auch in dieser Versuchsreihe hatten sich auf dem *Leucosolenia complicata*-Gel signifikant mehr Aufwuchsorganismen angesiedelt als auf den Kontrollgelen. Der Algenbewuchs auf den Gelen mit frischem, wässrigem Schwammextrakt war immer dichter als auf den korrespondierenden Rohextrakt-Gelen. Aufgrund der Extraktionsmethode unterschieden sich diese beiden Extrakte in der Metabolitenzusammensetzung und dadurch vermutlich auch in ihrer Wirkung. Verglichen mit den Kontrollen wurden auf den Gelen von *Pachymatisma johnstonia* (F) und *Leucosolenia complicata* (F) signifikant mehr *Grazer* gezählt (siehe Tab. 3.12). Diese Beobachtung lässt sich, wie bereits in der ersten Testreihe, auf den dichten Algenbewuchs zurückführen. Das Trigonellin-Gel zeichnete sich durch eine konstant geringe Besiedlung mit Algen und Invertebraten aus, was die für diese Substanz bekannte *Antifouling*-Wirkung andeutet (Miki et al. 1996).

Tabelle 3.12: Ergebnisse des *Antifouling*-Versuchs der 1. und 2. Testreihe (R=Roh- und F=frischer, wässriger Extrakt, H=Hexan-, E=Ethylacetat-, B=Butanol- und W=Wasserfraktion).

1. Testreihe	Algen	Aufwuchs	Grazer
Extrakt	Dichte	MW	MW
Kontrolle	3	2	15
<i>Pachymatisma johnstonia</i> (B)	1 ^{a)}	0	6 ^{c)}
<i>Pachymatisma johnstonia</i> (E)	1 ^{a)}	0	8 ^{c)}
<i>Esperiopsis fucorum</i> (R)	3	0	12
<i>Sycon ciliatum</i> (R)	2	1	12
<i>Leucosolenia complicata</i> (R)	2	6 ^{b)}	16
<i>Phakellia ventilabrum</i> (H)	2	0	20
<i>Isodictya palmata</i> (W)	2	0 ^{c)}	4 ^{c)}
<i>Myxilla fimbriata</i> (B)	1 ^{a)}	0	7 ^{c)}
Homarin	4	0	16
Inosin	4	1	17
Trigonellin	4	0	20

2. Testreihe	Algen	Aufwuchs	Grazer
Extrakt	Dichte	MW	MW
Kontrolle	1	17	24
<i>Cliona celata</i> (R)	2	24	19
<i>Cliona celata</i> (F)	3	10	12
<i>Pachymatisma johnstonia</i> (R)	1	24	15
<i>Pachymatisma johnstonia</i> (F)	3	50	54 ^{b)}
<i>Esperiopsis fucorum</i> (R)	2	12	19
<i>Leucosolenia complicata</i> (R)	1	44 ^{b)}	13
<i>Leucosolenia complicata</i> (F)	3	25	57 ^{b)}
<i>Phakellia ventilabrum</i> (R)	1	19	13
Trigonellin	1	9	5 ^{c)}

^{a)} signifikant weniger ($\alpha=0,05$) Algenbewuchs als gegenüber der Kontrolle; MW=Mittelwert

^{b)} signifikant mehr ($\alpha=0,05$) Invertebraten-Bewuchs gegenüber der Kontrolle

^{c)} signifikant weniger Grazer gegenüber der Kontrolle

Die Auswahl der Inkubationsdauer orientierte sich an der von Henrikson & Pawlik (1995) beschriebenen Besiedlung der Gele mit Invertebraten (Cirripedia, Bryozoa, Hydrozoa, Polychaeta) nach 14 Tagen. Jedoch dominierte auch bei diesen, in North Carolina durchgeführten Versuchen der Algenbewuchs, während Invertebraten nur vereinzelt auf den Gelen zu beobachten waren. Henrikson & Pawlik (1995) bewerteten die *Antifouling*-Wirkung gegenüber Algen und stuften eine von zwei Schwammarten als aktiv ein.

Da die Biofilmbildung und damit auch die Primärbesiedlung bereits wenige Stunden nach dem Ausbringen der Gele ins Freiland einsetzte, war die Inkubationszeit vermutlich zu lang, um definitive Aussagen bezüglich der *Antifouling*-Wirkung treffen zu können. Die beobachteten Effekte lassen eher Rückschlüsse auf Sukzessionsprozesse zu. Bei der Bewertung dieser Testmethode muss außerdem berücksichtigt werden, dass der Versuch die natürliche Freisetzung potentieller *Antifouling*-Substanzen aus dem Schwammgewebe durch Diffusion aus der Phytagelmatrix imitiert. Die Substanzkonzentration im Phytigel nimmt mit der Zeit ab. Im Schwammgewebe wird eine konstante Konzentration zur Aufrechterhaltung des Abwehrmechanismus angenommen. Diese Hypothese gilt jedoch nicht uneingeschränkt (vgl. Kapitel 3.5: Untersuchungen an *Pachymatisma johnstonia*).

Für alle filtrierenden Tiere ist die Besiedlung mit anderen Organismen ein Risikofaktor. Dies gilt besonders für Schwämme, da sie mit ihrem ausgedehnten Wasserkanalsystem eine große Oberfläche zur Ansiedlung bieten. Ein Überwachsen der Poren oder die Blockierung des Kanalsystems durch dichte Besiedlung mit Fremdorganismen könnte lebenswichtige Funktionen stören (Dyrynda 1985). Neben der chemischen Abwehr spielt auch die Oberflächenbeschaffenheit eine entscheidende Rolle (Becker & Wahl 1991). Ebenso wie die Phytagelmatrix ist die Schwammoberfläche nur bedingt für die Ansiedlung sessiler Tiere, wie zum Beispiel Seepockenlarven, geeignet. Letztere bevorzugen Hartsubstrat, da sie auf weichen Flächen leichter von der Strömung abgerissen werden können. Laut Wahl et al. (1997) wird das Ausmaß der Besiedlung mit Mikro- und Makroorganismen in Schwämmen durch die mechanischen und chemischen Effekte von Ausscheidungsprodukten (schleimigen Substanzen) und biologisch aktiven Metaboliten beeinflusst. Die Sekretion von Schleim, zusammen mit einer Kontrolle der Bakterienbesiedlung, kann vermutlich die Ansiedlung von Larven verhindern. Außerdem ist von *Halichondria panicea* bereits bekannt, dass durch regelmäßiges Erneuern des Pinacoderms unerwünschte Epibionten abgestoßen werden (Barthel & Wolfrath 1989).

Mit Ausnahme des *Haliclona rosea*-Extraktes zeigten alle Schwämme Hemmwirkung gegen mindestens zwei verschiedene Bakterienarten (Tab. 3.13). Die untersuchten Nordseeschwämme verfügen demnach über eine vergleichbare antibakterielle Wirkung, wie sie bereits für Schwämme anderer Habitate nachgewiesen wurde (Tab. 3.15). Die stärksten antibiotischen Effekte bewirkten Extrakte aus *Pachymatisma johnstonia* und *Esperiopsis fucuirom*. Sie hemmten das Wachstum von acht bzw. sieben der 30 getesteten Bakterienstämme.

*** starke Hemmwirkung ** mittlere Hemmwirkung * schwache Hemmwirkung	Proteobacteria								Gram-positive Bakterien					B
	α	β	β	γ	γ	γ	γ	γ	High GC		Low GC			
	<i>Roseobacter litoralis</i>	<i>Aquaspirillum psychrophilum</i>	<i>Comamonas testosteroni</i>	<i>Vibrio</i> sp.	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Pseudoalteromonas tetrodonis</i>	<i>Streptomyces purpureus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Microbacterium barkeri</i>	<i>Bacillus badius</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Suberites suberia</i>				**							***			
<i>Cliona celata</i>						*					**			
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	***			***	**	***		***		***				***
<i>Esperiopsis fucorum</i>				**	**	*	**				***	***	**	
<i>Sycon ciliatum</i>				**		**								
<i>Leucosolenia complicata</i>				**	*	**					***			
<i>Phakellia ventilabrum</i>				**	*	**	**				***			
<i>Myxilla rosacea</i>		***	**	**		**								
<i>Myxilla incrustans</i>				**			**		***					
<i>Isodictya palmata</i>				**		**					***		**	
<i>Halichondria panicea</i>		*							**		***			
<i>Haliclona cinerea</i>											***			
<i>Myxilla fimbriata</i>					**	*					***			
<i>Haliclona rosea</i>														
<i>Tetilla zetlandica</i>											***			
<i>Clathrina</i> sp.											**			
<i>Axinella infundibuliformis</i>											***			
		100 µg			200 µg		400 µg			keine Aktivität				

Es sind nur die gehemmten Bakterienstämme aufgeführt (marine Bakterien=blau, aus *Halichondria panicea* isolierte Bakterien=blau und fett, nicht-marine Bakterien=schwarz, B=Bakteroidetes).

Es sind nur die gehemmten Bakterienstämme aufgeführt (marine Bakterien=blau, aus *Halichondria panicea* isolierte Bakterien=blau und fett, nicht-marine Bakterien=schwarz, B=Bakteroidetes).

Da *Pachymatisma*-Extrakte nahezu ausschließlich gegen marine Bakterien aktiv waren, während *Esperiopsis*-Extrakte marine und nicht-marine Stämme zu gleichen Teilen hemmten, ist die Hemmwirkung vermutlich schwammartabhängig und je nach Bakterienstamm verschieden (Tab. 3.14, siehe auch Anhang S. 199 und 200). Dies verdeutlicht ein Vergleich der antibakteriellen Wirkung der Gattung *Haliclona*. Während Extrakte aus *Haliclona cinerea* (Kalifornien, Thompson et al. 1985; Amade et al. 1987) und *H. viscosa* (Arktis, Lippert 2003) starke antimikrobielle Wirkung zeigten, sind Arten wie *H. rosea* (eigene Beobachtung; Lippert 2003), *H. heterofibrosa* (Bergquist & Bedford 1978) und *Haliclona* sp. (McClintock & Gauthier 1992) inaktiv gegen Mikroorganismen. Auch wenn die *Haliclona*-Arten in den selben Habitaten siedeln und demnach den gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt sind, wirkt eine Art hemmend, die andere nicht (eigene Beobachtung und Lippert 2003). Abiotische und biotische Faktoren scheinen sich in geringerem Maße auf die antibakterielle Aktivität auszuwirken als artspezifische Eigenschaften.

Tabelle 3.14: Hemmwirkung der Schwammextrakte gegenüber den jeweiligen Bakterientaxa.

Schwammart	Archaea (n=1)	Proteobacteria				Gram- positive Bakterien		Bacteroi- detes (n=3)	Plancto- mycetales (n=1)
		α (n=3)	β (n=2)	γ (n=11)	δ (n=1)	HighGC (n=5)	LowGC (n=3)		
<i>Suberites suberia</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Cliona celata</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	0	1	0	4	0	2	0	1	0
<i>Esperiopsis fucorum</i>	0	0	0	4	0	1	2	0	0
<i>Sycon ciliatum</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Leucosolenia complicata</i>	0	0	0	3	0	1	0	0	0
<i>Phakellia ventilabrum</i>	0	0	0	4	0	1	0	0	0
<i>Myxilla rosacea</i>	0	0	2	2	0	0	0	0	0
<i>Myxilla incrustans</i>	0	0	0	2	0	1	0	0	0
<i>Isodictya palmata</i>	0	0	0	2	0	1	1	0	0
<i>Halichondria panicea</i>	0	0	1	0	0	2	0	0	0
<i>Haliclona cinerea</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Myxilla fimbriata</i>	0	0	0	2	0	1	0	0	0
<i>Haliclona rosea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tetilla zetlandica</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Clathrina</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Axinella infundibuliformis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Die größten Hemmhöfe waren auf den mit *Mikrobacterium barkeri* bewachsenen Testplatten sichtbar. Gegen dieses Bakterium zeigten zwölf der insgesamt 17 Schwammarten Aktivität (Abb. 3.15). Insgesamt wurden 13% der marinen Bakterien, 13% der schwammassoziierten und 20% der nicht-marinen Stämme gehemmt (siehe auch Anhang S. 199 und 200). Dies widerspricht den Ergebnissen von Bergquist & Bedford (1978) sowie Burkholder & Ruetzler (1969), die in allen Tests die stärksten Hemmeffekte gegenüber marinen Bakterien beobachteten.

Die Bewertung der Ergebnisse wird von den Autoren ebenfalls sehr unterschiedlich gehandhabt. Während Bergquist & Bedford (1978) Zonen ab 1 mm als aktiv ansahen, bewerteten Jensen et al. (1996) nur Hemmhöfe > 5 mm als wirksam. Die Mehrheit der Autoren interpretierte jede Art von Hemmhof als antimikrobielle Aktivität (Thompson et al. 1985; Kelman et al. 1998; Lippert 2003). Der Durchmesser des Hemmhofs ist zudem von den Diffusionseigenschaften der Substanz und des Nährmediums abhängig. Lipide diffundieren schlechter als wasserlösliche, polare Substanzen (Walls et al. 1993). Für die hier präsentierten Ergebnisse kann eine Verfälschung durch Diffusionseffekte ausgeschlossen werden, da keine signifikant größeren Hemmhöfe in polaren Phasen beobachtet wurden.

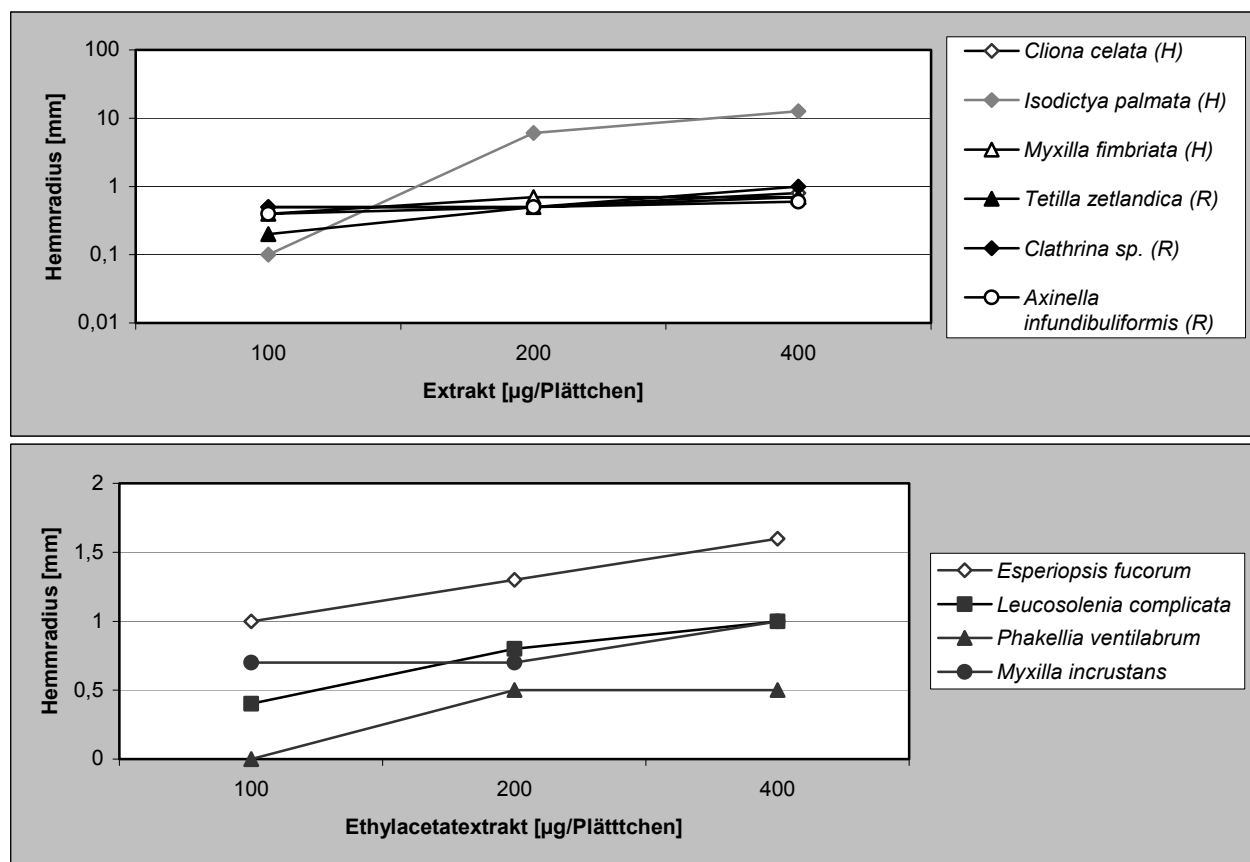


Abbildung 3.15: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung einiger Schwammextrakte gegenüber *Vibrio fischeri* (oben) und *Mikrobacterium barkeri* (unten, logarithmische Skalierung). (H)=Hexanfraktion, (R)=Dichlormethan/Methanol-Extrakt.

Auffallend viele Schwammarten (elf von 17) hemmten das Wachstum von *Vibrio*-Bakterien (γ -Proteobakterien). Übereinstimmend mit Burkholder & Ruetzler (1969), Thompson et al. (1985) und Amade et al. (1987) war die Hemmaktivität gegenüber Gram-positiven Bakterien (63%) größer als gegenüber Gram-negativen (47%, siehe auch Anhang S. 199 und 200). Dies weist darauf hin, dass die laut Hentschel et al. (2003) typischen schwammassozierten Proteo-, Actino- und Acidobakterien, die zur Gruppe der Gram-negativen gehören, weniger stark gehemmt werden als „schwammfremde“ Taxa. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass *Halichondria panicea* das Wachstum seiner eigenen Bakterien nicht hemmt.

Tabelle 3.15: Antibakterielle Aktivität von Schwämmen unterschiedlicher Regionen.

Region	Hemmung	Anzahl getesteter		Autor
		Schwammarten	Bakterienarten	
Neuseeland	76%	30	4	Bergquist & Bedford 1978
Polynesien	46%	15	12	Amade et al. 1982
Australien	79%	24	10	McCaffrey & Edean, 1985
Kalifornien	70%	40	7	Thompson et al. 1985
Mittelmeer	32%	28	20	Amade et al. 1987
Karibik	48%	33	8	Newbold et al. 1999
Spitzbergen	25%	4	5	Lippert 2003
Nordsee	97%	17	30	Zanker 2004

Amade et al. (1982) konnten keinen Nachweis antimikrobieller Aktivität in Extrakten von *Cliona celata* und *Pachymatisma johnstonia* erbringen, fanden jedoch schwache Wirkung in *Phakellia ventilabrum*. Inwieweit intraspezifische Variabilität in Bezug auf antimikrobielle Wirkung vorkommt, ist bisher noch nicht untersucht worden. Widersprüchliche Ergebnisse können sowohl durch die unterschiedliche Methodik (Extraktionsverfahren, getestete Bakterienarten) als auch durch Individuen und standortabhängige Variation der Sekundärmetabolitenzusammensetzung bedingt sein.

Die weltweite Verbreitung der antimikrobiellen Aktivität lässt darauf schließen, dass Mikroorganismen einen Selektionsdruck ausüben, der die Evolution von antibakteriellen Substanzen begünstigt (Tab. 3.1.5). Aufgrund ihrer Lebensweise kommen Schwämme ständig mit einer großen Anzahl von Mikroorganismen in Kontakt und sind den Angriffen schädlicher Bakterien ausgesetzt. Es ist anzunehmen, dass daher alle Arten Substanzen besitzen, um Pathogene erfolgreich abzuwehren. Schwämme, für die in antimikrobiellen Tests bisher keine

Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden möglicherweise noch nicht gegen die entscheidenden Bakterienarten getestet bzw. nutzen andere Schutzmechanismen (z.B. cytotoxische Wirkung). Echte schwammassoziierte Bakterien verfügen vermutlich über bestimmte Mechanismen, die sie vor der Verdauung durch Schwammzellen (zusätzliche Membranen und Schleimschichten) oder vor toxischen Schwammmetaboliten schützen (Friedrich et al. 2001). Dadurch sind sie in der Lage, Schwämme als geschütztes Habitat zu nutzen. Unter diesen Voraussetzungen könnte die antimikrobielle Wirkung auch auf einem Konkurrenzkampf zwischen den einzelnen Bakterientaxa basieren.

Einzelne Autoren beschreiben eine spezifische (Newbold et al. 1999, karibische Arten), andere wiederum eine Breitbandwirkung (Lippert 2003, *Haliclona viscosa*) der aktiven Substanzen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, dass beide Wirkungsweisen vorkommen. Abgesehen von der antimikrobiellen Aktivität, zeigen manche Antibiotika auch toxische Effekte gegen Protozoen oder wirken cytostatisch oder cytotoxisch (Nuhn 1997). Während toxisch wirkende Substanzen im Hemmhofstest klare, bakterienfreie Zonen um die Testplättchen hervorriefen, wurden cytostatisch wirkende Stoffe als Zonen mit vermindertem Wachstum wahrgenommen.

Neben der Hemmwirkung konnten auch wachstumsfördernde Effekte beobachtet werden. Wachstumsfördernde Wirkung bestimmter Arten würde die Hypothese unterstützen, dass Bakterien Schwammsymbionten mit positiven Eigenschaften sind. Bei einigen Bakterienstämmen (*Bacillus badius*, *Microbakterium barkeri*, *Aquaspirillum psychrophilum*, *Xanthomonas campestris*, *Zobellia uliginosa*, *Flavobacterium saccharophilum*) induzierten Schwammextrakte auch eine Änderung der Pigmentierung (Abb. 3.16). Effekte wie Wachstumssteigerung und veränderte Pigmentierung sind bisher in der Literatur nicht erwähnt. Deshalb kann zum momentanen Zeitpunkt noch keine Aussage darüber gemacht werden, wie häufig diese Phänomene auftreten oder welche Arten von Substanzen als Auslöser dafür in Frage kommen.

Da Bakterienstämme stetig Resistenzen gegen bekannte Antibiotika entwickeln, besteht ein ständiger Bedarf an neuen wirkungsvolleren Substanzen. Bis jetzt spielen aus marinen Organismen stammende Metaboliten noch keine kommerzielle Rolle. Hinweise auf geeignete Substanzen, die auch in geringen Konzentrationen wirksam sind, gibt es, jedoch bereitet die Gewinnung dieser Stoffe oft Schwierigkeiten. Die Mehrzahl der bekannten Wirkstoffe wird von bodenbewohnenden Mikroorganismen (z.B. *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp.) produziert. Die aktiven Substanzen stammen aus unterschiedlichen Stoffklassen (Aminoglykosid-, Polyketid-,

Aminosäure-, Isoprenoid- und Nucleosid-Derivate). Am weitesten verbreitet sind Purinnucleosidderivate, die besonders toxisch gegenüber Bakterien und tierischen Zellkulturen sind, wenn sie strukturelle Veränderungen am C3 aufweisen (z.B. Puromycin aus *Streptomyces alboniger*). Seltener sind antibiotisch wirkende Pyrimidinnucleoside mit Veränderungen am C2, wie zum Beispiel die aus dem Schwamm *Cryptothetica crypta* isolierten Arabinoside Spongouridin (1-b-D-Arabinofuranosyluracil; Ara-A) und Spongothymidin (1-b-D-Arabinofuranosylthymidin). Die aus den Nordseeschwämmen isolierten und gegen *Vibrio harveyi* und *Microbakterium barkeri* getesteten Substanzen Inosin, Homarin, Trigonellin, Allantoin und Morpholin zeigten keine antibakterielle Wirkung.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Aussagekraft eines antibakteriellen Tests stark von der Wahl der Bakterienstämme abhängt. Daneben spielen auch die eingesetzten Extraktkonzentrationen eine Rolle. Niemand weiß, wie die natürliche Zusammensetzung verschiedener Substanzen im Schwamm ist oder in welchen Konzentrationen die Substanzen natürlicherweise im Schwamm aktiv sind.

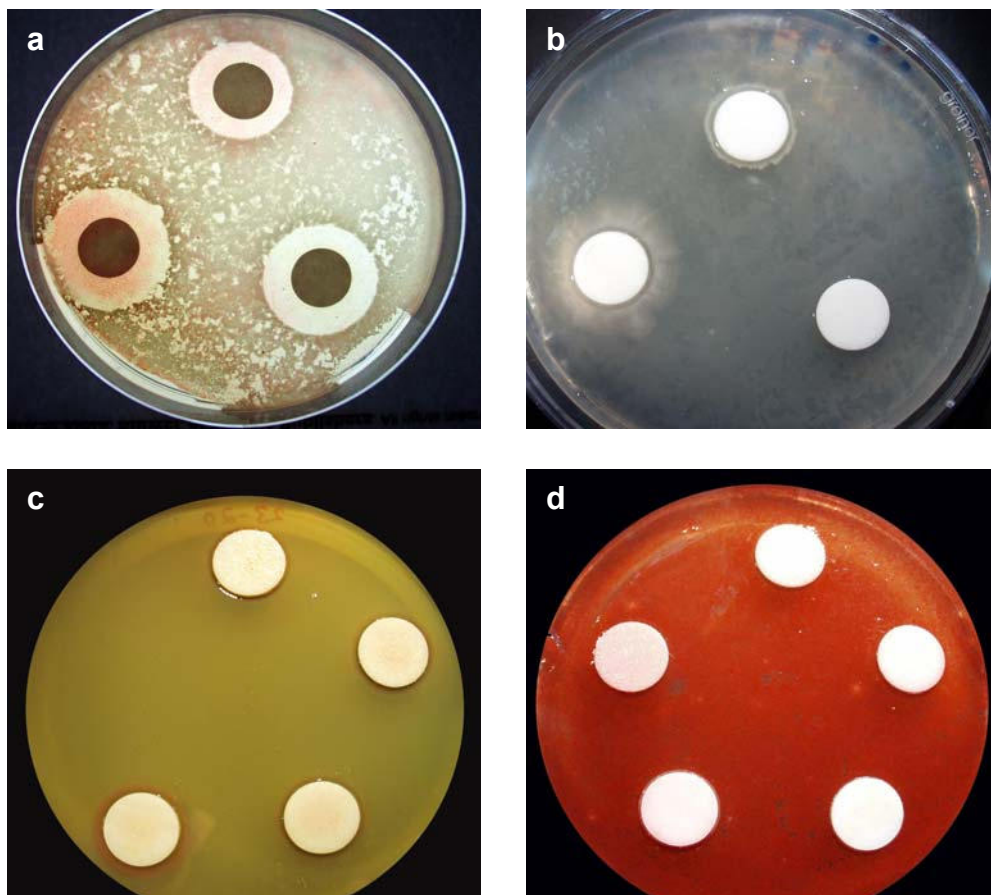


Abbildung 3.16: (a) Hemmhöfe (Essigesterphase von *Pachymatisma johnstonia* auf *Vibrio* sp.), (b) gesteigertes Bakterienwachstum, (c) Bakterienrasen von *Microbakterium barkeri* in Originalfärbung, (d) mit veränderter Pigmentierung.

3.3.4 Enzyminhibition (Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)-Test)

In dem durchgeführten PTK-Test wurde EGFR (*epidermal growth factor receptor*) als Tyrosin-Kinase eingesetzt. Diese Rezeptor-Tyrosin-Kinase wird im menschlichen Körper durch die Bindung eines Liganden aktiviert. Bei Krebserkrankungen ist dieser Signalprozess gestört und es kommt zu einer Fehlregulierung des Enzyms. Momentan befinden sich zwei EGFR-hemmende Substanzen in klinischen Tests zur Krebstherapie (Noble et al. 2004, siehe Abb. 3.17).

Rohextrakte von sieben der 17 getesteten Schwammarten zeigten bei einer Konzentration von 1,5 mg/ml enzyminhibitorische Wirkung gegenüber EGFR (Tab. 3.16). Die photometrisch bestimmte Restaktivität (EA_R) war überwiegend größer als die der zur Kontrolle eingesetzten Hemmsubstanz Piceatannol (EA_R 2-11%). Nur die Butanolphase von *Pachymatisma johnstonia* sowie der Rohextrakt von *Myxilla fimbriata* erzielten eine ähnlich starke Hemmwirkung (Tab. 3.16). Aktive Fraktionen wurden in einer Verdünnungsreihe von 1; 0,75; 0,5; 0,25 und 0,1-facher Verdünnung erneut getestet. Die im ersten Versuchsansatz gemessene starke Aktivität von *Tetilla zetlandica* war im Konzentrationsversuch nicht reproduzierbar. *Myxilla fimbriata* zeigte noch bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml Hemmwirkung, was vermutlich durch das in den Extrakten nachgewiesene Morpholin hervorgerufen wurde. Diese Substanz besitzt ebenso wie die aus *P. johnstonia* isolierten, bisher nicht identifizierten Fraktionen PAJO3BD2 und PAJOBD7 sowie die Metaboliten Betain, L-6-Bromohypaphorin und N,N,N-Trimethyl-β-alanin eine starke, enzyminhibitorische Wirkung. Auch das aus einer Ascidie aus dem Bereich der Orkneys isolierte Tubastrin zeigte EGFR-Hemmaktivität (J. Barenbrock, persönliche Mitteilung). Homarin, Trigonellin, Inosin und Allantoin waren reproduzierbar inaktiv (Tab. 3.17).

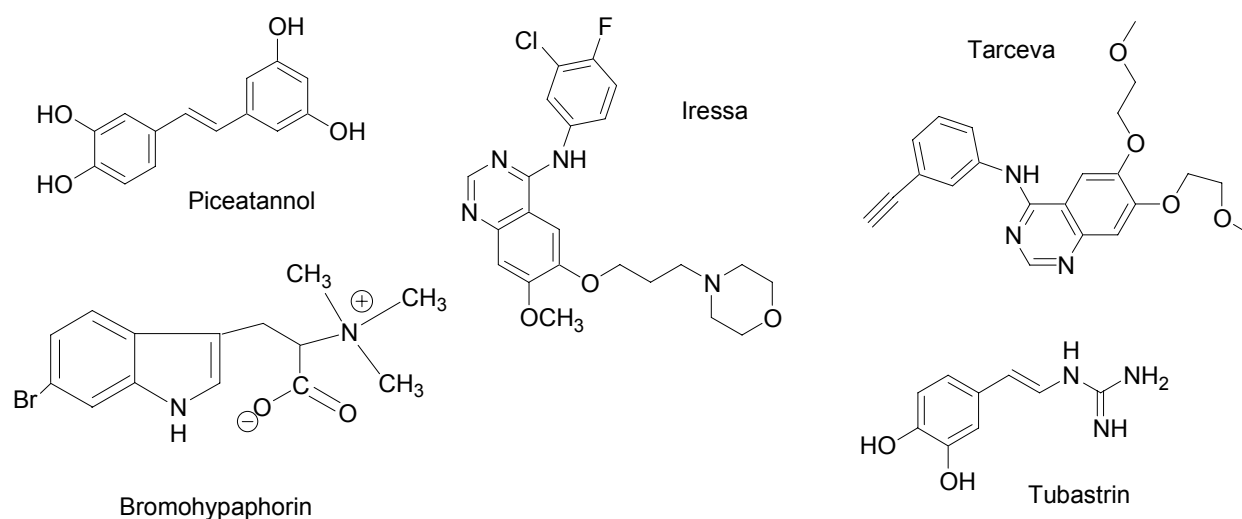


Abbildung 3.17: Bekannte EGFR-Inhibitoren, Schwamm- und Ascidienmetaboliten mit enzyminhibitorischer Funktion (Quelle: Nobel et al. 2004 und J. Barenbrock, persönliche Mitteilung).

Tabelle 3.16: Protein-Tyrosin-Kinase Hemmaktivität der Schwammextrakte. (C=Verdünnungsreihe der Ausgangskonzentration 1=200µg/ml; Hemmeffekte ***stark, **deutlich, *schwach; EA_R=Enzymrestaktivität, W=Wirkungsstärke, R=Rohextrakt, H=Hexan-, E=Ethylacetat-, B=Butanol-, W=Wasserfraktion, N= nicht getestet).

Schwamm		EA _R	W	C	EA _R	W
Suberites suberia	R	244,6	+			
	H	142,0	+			
	E	77,8	-			
	B	231,3	+			
	W	134,7	-			
Cliona celata	R	126,1	-	1	30,7	*
	H	140,7	+	0,75	75,5	-
	E	51,9	-	0,5	79,7	-
	B	40,3	*	0,25	104,8	-
	W	155,8	+	0,1	110,1	-
Pachymatisma johnstonia	R	130,8	-	1	11,1	***
	H	195,0	+	0,75	38,9	*
	E	121,3	-	0,5	54,3	-
	B	35,1	*	0,25	73,5	-
	W	129,4	-	0,1	80,2	-
Esperiopsis fucorum	R	197,5	+			
	H	155,7	+			
	E	197,5	+			
	B	190,6	+			
	W	145,8	+			
Sycon ciliatum	R	187,6	+			
	H	203,9	+			
	E	n				
	B	182,4	+			
	W	192,3	+			
Leucosolenia complicata	R	83,8	-			
	H	155,7	+			
	E	N				
	B	266,8	+			
	W	182,4	+			
Phakellia ventilabrum	R	179,8	+			
	H	164,3	+			
	E	152,7	+			
	B	166,9	+			
	W	133,3	-			
Myxilla rosacea	R	134,6	-			
	H	115,6	-			
	E	97,6	-			
	B	286,2	+			
	W	185,0	+			
Myxilla incrustans	R	178,1	+			
	H	176,0	+			
	E	257,4	+			
	B	152,3	+			
	W	85,9	-			

Schwamm		EA _R	W	C	EA _R	W
Haliclona rosea	R	36,5	*			
	H	88,2	-			
	E	57,1	-			
	B	28,7	*			
	W	185,4	+			
Isodictya palmata	R	112,6	-			
	H	158,3	+			
	E	194,0	+			
	B	228,1	+			
	W	115,6	-			
Halichondria panicea	B	38,1	*	1	40,6	-
	H	140,6	+	0,75	69,9	-
	E	80,3	-	0,5	46,7	-
	B	161,7	+	0,25	83,4	-
	W	39,4	*	0,1	82,0	-
Tetilla zelandica	B	6,2	***	1	73,1	-
	H	n		0,75	57,6	-
	E	n		0,5	75,7	-
	B	n		0,25	111,0	-
	W	n		0,1	70,6	-
Haliclona cinerea	B	36,0	*	1	42,7	-
	H	56,6	-	0,75	54,1	-
	E	89,4	-	0,5	54,2	-
	B	97,1	-	0,25	60,3	-
	W	77,7	-	0,1	66,4	-
Myxilla fimbriata	B	85,1	-	1	4,3	***
	H	137,6	-	0,75	2,8	***
	E	156,6	+	0,5	2,6	***
	B	147,1	+	0,25	40,5	-
	W	141,5	+	0,1	40,3	-
Clathrina sp.	R	48,0	-			
	H	137,2	-			
	E	14,4	**			
	B	70,0	-			
	W	153,6	+			
Axinella infundibuliformis	R	196,2	+			
	H	N				
	E	N				
	B	N				
	W	N				

0-40	PTK-Hemmung	*
41-140	keine Wirkung	-
> 140	PTK-Aktivierung	+

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch Nordseeschwämme PTK-hemmende Substanzen enthalten. Mit 35% war der Anteil aktiver Arten (sechs von 17) verglichen mit Untersuchungen anderer Autoren relativ hoch. Während de Vries et al. (1997) bei 6% (20/321) der Schwämme Australasiens Aktivität feststellten, und Kirsch (1999) Hemmwirkung bei 5% (4/78) der hauptsächlich tropischen Schwammarten fand, konnte Brown (2001) bei 33% (2/6) der von den Florida Keys stammenden Individuen inhibitorische Effekte nachweisen. De Vries et al. (1997) folgerten aus ihren Ergebnissen, dass Protein-Kinase-(PK)-Inhibition einen unter Schwämmen weit verbreiteten Verteidigungsmechanismus darstellt. Indem sie die Signalweiterleitung im Organismus beeinflussen, sind Protein-Kinasen in die Entwicklungsvorgänge verschiedener Invertebraten-Larven (Hydrozoa, Cirripedia) involviert (Fusetani 2004). Demnach könnten enzymhemmende Substanzen die Metamorphose von Larven verhindern und damit die Ansiedlung von Konkurrenten und Überwuchsorganismen abwehren. Der PTK-Test stellt somit eine gute *Screening*-Möglichkeit im Hinblick auf die Isolierung sowohl ökologisch als auch pharmakologisch relevanter Substanzen dar. Generell scheint die Enzymhemmung in Kalkschwämmen weniger verbreitet zu sein als in Kieselschwämmen. *Leucosolenia complicata* enthält ebenso wie *Sycon ciliatum* keine enzymhemmenden Substanzen, während *Clathrina* sp. eine schwache Aktivität zeigt. Auch bei den Demospongiae war die Hemmwirkung nicht überall nachweisbar und häufig unterschiedlich stark ausgeprägt.

Tabelle 3.17: Übersicht der Protein-Tyrosin-Kinase-Hemmung aufgereinigter Fraktionen und Reinsubstanzen. (Hemmeffekte *** stark, ** deutlich, * schwach; EA_R=Enzymrestaktivität, E=Ethylacetat-, B=Butanol-, W=Wasserfraktion; Testkonzentration = 150µg/ml).

Fraktion	EA _R	Wirkung	Substanz
PAJOEL7D2	32,8	*	-
PAJOEL12	5,9	***	L-6-Bromohypaphorin
PAJOB1D1	65,0	-	-
PAJOB1D2	1,8	***	-
PAJOB1D3B	89,3	-	-
PAJOB1D3C	69,7	-	-
PAJOB1D5III	77,6	-	Betain
PAJOB1D5IV	114,5	-	Trigonellin
PHVEWL6D5	57,3	-	-
PHVEWL3D13	91,8	-	Zooanemonin
ISPABL13D8	61,4	-	Homarin
ISPAWD1	96,1	-	Inosin
ISPAWD4	144,4	+	Homarin
ISPAWD6	111,0	-	Trigonellin
MYFIED4	10,3	**	Morpholin
MYFIBL12	67,0	-	Allantoin
MYFIBL13	64,1	-	Allantoin

Häufig induzierten mehrere Fraktionen der Schwämme ohne Hemmwirkung (*Suberites suberia*, *Esperiopsis fucorum*, *Sycon ciliatum*, *Leucosolenia complicata*, *Phakellia ventilabrum*, *Myxilla incrustans* und *Isodictya palmata*) eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität. *Cliona celata*, *P. johnstonia*, *Haliclona rosea*, *Halichondria panicea*, und *Clathrina* sp. enthielten sowohl inhibierend als auch aktivierend wirkende Fraktionen.

Zusätzlich zu der oben beschriebenen Untersuchung der Extrakte wurde die enzym-inhibitorische Wirkung dreier, in Pinacoderm und Mesohyl bzw. Bakterien- und Schwammzellen getrennter, Individuen getestet (Tab. 3.18). Die Lokalisierung der Hemmaktivität innerhalb des Schwammes erlaubt Rückschlüsse bezüglich des Syntheseortes und des Wirkungsbereichs sowie der ökologischen Funktionen der aktiven Substanzen. Innerhalb von *Cliona celata* war die inhibitorische Wirkung eindeutig in den Schwammzellen des Mesohyls konzentriert. Die PTK-Hemmung von *Pachymatisma johnstonia* ließ sich nicht so deutlich lokalisieren. Sowohl der Mesohyl- als auch der Pinacodermextrakt der Schwammzellen und der Mesohylextrakt der Bakterienzellen zeigten Aktivität. Weder der Rohextrakt der Schwamm- noch der Bakterienzellen von *Leucosolenia complicata* verursachte eine PTK-Inhibition (Tab. 3.18). Die Lokalisierung der Aktivität im Mesohyl von *Cliona celata* und *Pachymatisma johnstonia* schließt assoziierte Bakterien als Verursacher der Hemmwirkung weitgehend aus. Eine enzyminhibierende Wirkung der Bakterienzellextrakte von *P. johnstonia* lässt sich vermutlich auf eine unzureichende Trennung der Zelltypen zurückführen (vgl. Kapitel 3.5). Interessant ist auch, dass sich bei *C. celata* die PTK-Inhibition komplett auf das Mesohyl beschränkte, während in *P. johnstonia* sowohl im Pinacoderm als auch im Körperinneren Aktivität nachgewiesen wurde. Diese Beobachtung ist möglicherweise im Zusammenhang mit einer *Antifouling*-Funktion zu sehen und wird in Kapitel 3.5 eingehend diskutiert.

Tabelle 3.18: Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibition verschiedener Schwammpartitionen. (Hemmeffekte: ***stark, **deutlich, *schwach; - keine Hemmwirkung, EA_R=Enzymrestaktivität, W=Wirkungsstärke; Testkonzentration: 200µg/ml)

	Schwammzellen				Bakterienzellen			
	Pinacoderm EA _R	W	Mesohyl EA _R	W	Pinacoderm EA _R	W	Mesohyl EA _R	W
<i>Cliona celata</i>	66,2	-	0,2	***	105	-	127	-
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	22,7	*	15,9	**	47	-	36,8	*
<i>Leucosolenia complicata</i>	49,9	-			76,6	-		

3.3.2 Cytotoxische Aktivität

Myxilla incrustans und *Cliona celata* zeigten die stärkste cytotoxische Aktivität. Extrakte dieser Arten sowie der Rohextrakt von *Haliclona rosea* bewirkten eine Zellkernfragmentierung. Ebenfalls aktiv waren die Essigesterphasen von *Sycon ciliatum*, *Myxilla rosacea*, *Haliclona cinerea* und *Halichondria panicea* sowie die Hexanphase von *Phakellia ventilabrum*. Extrakte der genannten Arten wirkten bereits ab einer Konzentration von 7 µg/ml toxisch (Tab. 3.19).

Tabelle 3.19: Cytotoxische Wirkung der Schwammextrakte. MIC=minimale Inhibitions-konzentration [µg/ml] (Fettdruck: Zellkernfragmentierung tritt auf, N: nicht getestet, - keine Wirkung).

Schwammextrakt		MIC	Schwammextrakt		MIC	Schwammextrakt		MIC
<i>Suberites suberia</i>	R	-	<i>Myxilla rosacea</i>	R	-	<i>Tetilla zetlandica</i>	R	-
	H	-		H	-		H	N
	E	21		E	7		E	N
	B	-		B	-		B	N
	W	-		W	-		W	N
<i>Cliona celata</i>	R	-	<i>Myxilla incrustans</i>	R	7	<i>Clathrina</i> sp.	R	-
	H	7		H	-		H	N
	E	7		E	0,25		E	N
	B	-		B	-		B	N
	W	-		W	-		W	N
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	R	-	<i>Isodictya palmata</i>	R	-	<i>Axinella infundibuliformis</i>	R	-
	H	-		H	-		H	N
	E	-		E	21		E	N
	B	-		B	-		B	N
	W	-		W	-		W	N
<i>Esperiopsis fucorum</i>	R	-	<i>Halichondria panicea</i>	R	-			
	H	-		H	-			
	E	-		E	7			
	B	-		B	-			
	W	-		W	-			
<i>Sycon ciliatum</i>	R	-	<i>Haliclona cinerea</i>	R	-			
	H	21		H	-			
	E	7		E	7			
	B	-		B	-			
	W	-		W	-			
<i>Leucosolenia complicata</i>	R	-	<i>Myxilla fimbriata</i>	R	-			
	H	21		H	-			
	E	62		E	-			
	B	-		B	-			
	W	-		W	-			
<i>Phakellia ventilabrum</i>	R	62	<i>Haliclona rosea</i>	R	7			
	H	7		H	N			
	E	62		E	N			
	B	-		B	N			
	W	-		W	N			

Die in den antimikrobiellen Versuchen besonders aktiven Schwämme *Pachymatisma johnstonia* und *Esperiopsis fucorum* zeigten, ebenso wie *Tetilla zetlandica*, *Clathrina* sp. und *Axinella infundibuliformis*, keine Wirkung im MTT-Test. Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Schwammgattungen wurde bisher bei *Tetilla*, *Suberites*, *Cliona*, *Axinella*, *Phakellia*, *Halichondria*, *Myxilla* und *Haliclona* cytotoxische Aktivität nachgewiesen (Schmitz 1994). Aufgrund der beobachteten Inaktivität einiger Nordseeschwämme kann eine cytotoxische Wirkung nicht automatisch für alle Arten einer Gattung angenommen werden. Unter den untersuchten Nordseearten zeigte eine von drei untersuchten *Myxilla*-Arten, ebenso wie *Tetilla zetlandica* und *Axinella infundibuliformis*, keine Aktivität. Cytotoxische Aktivität gegen Murin-Tumor-Zellen wurde bisher bei zahlreichen Schwämmen nachgewiesen (Tab. 3.20). Munro et al. (1994) beschrieben eine Konzentration von $IC_{50}=1,5 \mu\text{g/ml}$ als signifikant cytotoxisch. Mit einer minimalen Inhibitionskonzentration (MIC) von $7 \mu\text{g/ml}$ ist die Cytotoxizität der meisten Nordseeschwammextrakte demnach als schwach einzustufen. Nur die Ethylacetatphase von *Myxilla incrustans* war mit einer MIC von $0,25 \text{ mg/ml}$ besonders aktiv. Torres et al. (2002) isolierten aus *Arenosclera brasiliensis* vier cytotoxische Alkylpiperidinalkaloide. Die Arenosclerine A-C und Haliclonaacyclamin E wirkten in Konzentrationen von $2,3\text{--}3,8 \mu\text{g/ml}$ toxisch. Weitere bekannte Substanzen mit cytotoxischer Aktivität sind die cyclischen Peptide Phakellistatin (*Phakellia constata*) und Axinastatin 1 (*Axinella* sp.) sowie die Alkaloide Haliclamine A und Halitoxin aus *Haliclona*-Arten (Schmitz 1994).

Abgesehen von Schwämmen wurde cytotoxische Aktivität für viele benthische Invertebraten beschrieben (z.B. mediterrane Arten; vgl. Uriz et al. 1991, 1992). Man nimmt an, dass die cytotoxische Wirkung einen multiplen Schutzmechanismus zur Abwehr von Larven, Embryonen, Sporen oder adulten Invertebraten darstellt, die als mögliche Konkurrenten um Siedlungsfläche oder als *Fouling*-Organismen die Schwämme gefährden könnten.

Tabelle 3.20: Naturstoffe aus Schwämmen mit cytotoxischer Aktivität gegenüber Murin-Tumor-Zelllinien (Quelle: Torres et al. 2002; Mayer & Gustafson 2003).

Substanz	Substanzklasse	MIC [$\mu\text{g/ml}$]
Hachijodin A-G	Alkylpyridin	1-2,2
Mycalamid C und D	Alkaloid	0,035-0,095
Pelorusid A	Macrolid	0,010
Plakortid I und J	Polyketid	7-9
Arenosclerine A-C	Alkylpiperidinalkaloid	2,17-2,34
Haliclonaacyclamin E	Alkylpiperidinalkaloid	3,89

3.3.6 Zusammenfassung der biologischen Aktivität der Schwammextrakte

Alle untersuchten Schwämme waren in mindestens einem der durchgeführten Biotests aktiv. Während sich die Aktivität bei *Haliclona rosea* auf cytotoxische Effekte beschränkte, zeigten Extrakte von *Esperiopsis fucorum*, *Clathrina* sp. und *Axinella infundibuliformis* ausschließlich antibakterielle Wirkung (Tab. 3.21).

Tabelle 3.21: Zusammenfassung der biologischen Aktivität der Nordseeschwammextrakte. (**** maximale Aktivität, *** starke Aktivität, ** Aktivität, * schwache Aktivität, – inaktiv).

Schwammart	Antilaryale Aktivität	Antifouling Aktivität	Antigrazer Aktivität	Antibakterielle Aktivität	Enzym-inhibition	Cyto-toxizität
<i>Suberites suberia</i>	**	-	-	*	-	-
<i>Cliona celata</i>	****	-	-	*	**	****
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	*	-	****	****	**	-
<i>Esperiopsis fucorum</i>	-	-	-	****	-	-
<i>Sycon ciliatum</i>	**	-	-	**	-	***
<i>Leucosolenia complicata</i>	****	-	-	**	-	**
<i>Phakellia ventilabrum</i>	***	-	-	***	-	****
<i>Myxilla rosacea</i>	**	-	-	**	-	**
<i>Myxilla incrustans</i>	-	-	-	**	-	****
<i>Haliclona rosea</i>	**	-	-	-	-	**
<i>Isodictya palmata</i>	**	****	**	**	-	*
<i>Halichondria panicea</i>	**	-	-	**	**	**
<i>Tetilla zetlandica</i>	**	-	-	*	****	-
<i>Haliclona cinerea</i>	-	-	-	*	**	***
<i>Myxilla fimbriata</i>	-	-	**	**	-	-
<i>Clathrina</i> sp.	-	-	-	*	-	-
<i>Axinella infundibuliformis</i>	-	-	-	*	-	-

Zu 80% wirkten Schwämme mit cytotoxischer Aktivität auch antilarval. Neben *Isodictya palmata*, der nur im PTK-Test inaktiv war, wiesen auch Extrakte aus *Cliona celata* und *Pachymatisma johnstonia* ein breites Wirkungsspektrum auf. Mit einer starken antilarvalen, cytotoxischen und antibakteriellen Aktivität enthielt *Phakellia ventilabrum* die vergleichsweise wirksamsten Substanzen. Dieser Schwamm scheint, ebenso wie andere Arten dieser Gattung, eine Reihe biologisch aktiver Metaboliten zu enthalten (vgl. Kapitel 3.4.1). Abgesehen von dieser Beobachtung führten die Ergebnisse der Biotests eher zu der Annahme, dass die biologische Wirkung artspezifisch unterschiedlich ausgeprägt ist. Auch Untersuchungen anderer Autoren deuten dies an (vgl. Kapitel 3.3.3).

Die Entdeckung ungewöhnlicher, komplexer Strukturen und der Nachweis außergewöhnlich hoher Metabolitenkonzentrationen im Gewebe sessiler Organismen führte zu der Annahme, dass die Produktion biologisch aktiver Substanzen hohe metabolische Kosten verursacht, die zu Lasten von Fortpflanzung oder Wachstum gehen (Pawlik 1993). Diese Hypothese scheint gewagt, wenn man bedenkt, dass mobile Organismen Energie investieren, um ihre Beweglichkeit und morphologische Abwehr zu gewährleisten. Die Produktion von Sekundärmetaboliten stellt lediglich eine andere Art von Verteidigungsstrategie dar, die mit der Evolution der Sessilität einherging. Auch die Möglichkeit, dass Sekundärmetaboliten Nebenprodukte biosynthetischer Stoffwechselwege, Abfall- oder Entgiftungsprodukte sind und ungenutzt im Gewebe angereichert werden, wurde diskutiert (Haslam 1986). Betrachtet man die hohe Diversität und Abundanz von Schwämmen, stellt die Entwicklung biologisch aktiver Substanzen eher einen entscheidenden evolutiven Vorteil dar. Auch die Tatsache, dass ein Metabolit multifunktional sein kann, unterstreicht die Effektivität und Rationalität der chemischen Verteidigung. In Versuchen von Thompson et al. (1985) zeigten Substanzen mit antimikrobieller Wirkung auch in mindestens einem Antilarval- und einem Fraßhemmtest Aktivität. Van de Vyver et al. (1990) schlossen aus ihren Ergebnissen, dass toxische Substanzen Mehrzweckwaffen mit einem breiten Spektrum biologischer Aktivität sind. Biologisch aktive Substanzen können sowohl gegen Mikro- als auch Makroorganismen wirken und durch cytotoxische, enzyminhibitorische (Störung der Signalfunktion) und antibiotische Effekte Prädation und Besiedlung bzw. Überwuchs verhindern. Thompson et al. (1985) vermuteten, dass antimikrobielle Substanzen auch abschreckende Wirkung gegenüber Schnecken, Seesternen und Fischen haben. Durch die Abwehr der Fraßaktivität verhindern Schwämme das Abweiden eng benachbarter oder epibiontischer Organismen (Algen, Seepocken) und beugen damit einer Schädigung ihres Pinacoderms vor. Antimitotisch und cytotoxisch wirkende Substanzen verhindern auf direktem Wege die Ansiedlung von Larven und reduzieren das *Fouling*.

Antimikrobiell aktive Substanzen hemmen die Entwicklung von Biofilmen und verhindern damit indirekt die Ansiedlung von Bewuchsorganismen. In diesem Zusammenhang beobachteten Stiefker et al. (2000), dass die Umwandlung und das Festsetzen von Hydrozoenlarven wie z.B. *Hydractinia echinata* durch Bakterien im Biofilm des Substrates ausgelöst werden. Das alles macht *Antifouling* zu einem komplexen Sachverhalt, der vielfältige Mechanismen einschließt. Gleichzeitig ist es ein Thema von hoher Signifikanz im Anwendungsbereich mariner Naturstoffe, vor allem auch im Hinblick auf den Schutz der Meere (vgl. Kapitel 1.2.4).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Schwämme aller Breitengrade und Habitate eine hohe biologische Aktivität zeigen (McClintock 1987; Munro et al. 1989; Uriz et al. 1991). Weltweit wurde im Durchschnitt bei 50% aller untersuchten Arten biologische Aktivität nachgewiesen (Tab. 3.22). Das breite Wirkungsspektrum und die strukturelle Diversität der Schwammmetaboliten auf Gattungsebene führten häufig zu dem Schluss, dass assoziierte Organismen an deren Produktion beteiligt sind (Bergquist 1978; Kobayashi & Kitagawa 1998).

Tabelle 3.22: Biologische Aktivität in Schwämmen verschiedener Habitate (D=Demospongiae, C=Calcarea, kA=keine Angaben).

Habitat (Testkonzentration)	Biologische Aktivität	Untersuchte Schwammtaxa	Extraktions- methode	Autor
Kalifornien (kA)	70% (28/40)	D & C	Methanol	Thompson et al. 1985
Bretagne (0,05 mg/g)	48% (13/27)	D & C	Methanol	van de Vyver et al. 1990
Mittelmeer (0,05 mg/g)	54% (14/26)	D & C	Methanol	van de Vyver et al. 1990
Mittelmeer (1 mg/g)	50% (53/59)	D & C	kA	Uriz et al. 1992
Spitzbergen (kA)	25% (1/4)	D	DCM/MeOH	Lippert 2003
Nordsee (10 mg/ml)	100% (17/17)	D & C	DCM/MeOH	Zanker 2004

Zur Ermittlung der biologischen Aktivität von Schwammextrakten gibt es keine einheitlichen Verfahren. Es werden sowohl Extrakte als auch Reinsubstanzen getestet. Auch wenn das Testprinzip ähnlich ist, variieren die eingesetzte Konzentration und die Durchführung je nach Autor. Das erschwert einen Vergleich der publizierten Ergebnisse. Bei der Bewertung der biologischen Aktivität von Extrakten muss berücksichtigt werden, dass Testkonzentration und Metabolitenzusammensetzung nicht den natürlichen Verhältnissen entsprechen. Rohextrakte enthalten eine Mischung verschiedener Substanzklassen (Salze, Fettsäuren, Peptide, Sekundärmetaboliten), die sich gegenseitig beeinflussen und die Wirkung aktiver Metaboliten abschwächen oder verstärken können. Das Verschwinden der biologischen Aktivität im Verlauf

der Aufreinigung ist besonders gut bei einer *bioassay guided fractionation* nachvollziehbar und kann auf solche synergistischen Effekte hindeuten. Während Lippert (2003) keine synergistischen Effekte von Reinsubstanzen in antimikrobiellen Tests nachweisen konnte, beobachteten Newbold et al. (1999), dass Rohextrakte größere Hemmhöfe induzierten als die daraus isolierten Reinsubstanzen. Außerdem können abhängig vom Extraktionsverfahren im Verlauf der Aufarbeitung einsetzende chemische Prozesse die ursprünglich in den Schwammgeweben vorkommenden Metaboliten modifizieren (Martin & Uriz 1993).

Inwiefern Labortests Aussagen über die ökologische Funktion von Metaboliten erlauben, wird kontrovers diskutiert. Laut Thompson et al. (1985) bieten Standardverfahren wie der Hemmhof- und *Artemia*-Test gute *Screening*-Mechanismen zur Bestimmung des ökologischen Potentials von Metaboliten. Pawlik et al. (1995) hingegen bewiesen, dass die Toxizität von Metaboliten keine Rückschlüsse auf die fraßabschreckende Wirkung zulässt. Im Hinblick auf ökologische Fragestellungen sind aussagekräftige Testmethoden nach wie vor selten. Gut etabliert sind bisher Fraßtests mit tropischen Fischen, die sowohl im Freiland als auch im Labor durchgeführt wurden (Pawlik et al. 1995; Schupp et al. 1999; Assmann et al. 2000). Untersuchungen zur chemischen Abwehr von Mikroorganismen, Algen und Invertebraten beschränkten sich auf Laborversuche (Bergquist & Bedford 1978; Wahl 1989; Davis et al. 1991; Newbold et al. 1999).

Die Selektion der biologischen Aktivität wird durch die Interaktion mit Prädatoren, Konkurrenzarten und Mikroorganismen beeinflusst, welche einen Selektionsdruck auf die Ausbildung der biologischen Aktivität ausüben (van de Vyver et al. 1990). Im Gegensatz zu tropischen Regionen spielen Fische in kalt gemäßigten Breiten keine Rolle als Schwammprädatoren (Lippert 2003; eigene Beobachtung). Hier scheinen Interaktionen mit Mikroorganismen und adulten sowie juvenilen benthischen Invertebraten zur Entwicklung komplexer ökologischer Beziehungen geführt zu haben, die sich erst verdeutlichen lassen, wenn der Schwamm als Teil des gesamten Habitats studiert wird.

Da sich ökologische Sachverhalte durch eine hohe Komplexität auszeichnen, sind sie schwer zu untersuchen und zu durchschauen. Häufig fehlen geeignete Testmethoden, um Interaktionen zu untersuchen und Wirkungsweisen festzustellen. Eine getrennte Diskussion der biologischen Aktivitäten ist bei dem Versuch, ökologische Zusammenhänge aufzudecken, unmöglich.

3.3.7 Korrelationen und Vergleich zwischen Demospongiae und Calcarea

Da anzunehmen ist, dass Schwammarten, die vergleichbaren abiotischen und biotischen Bedingungen ausgesetzt sind, ähnliche Verteidigungsmechanismen besitzen, wird häufig versucht, Korrelationen zwischen chemischer Schutzwirkung und biologischen Charakteristika zu finden. Übereinstimmend mit van de Vyver et al. (1990) zeigten die hier präsentierten Ergebnisse keinen Zusammenhang zwischen biologischer Aktivität und taxonomischen, morphologischen oder habitatspezifischen Kriterien. Korrelationen wurden weder in den einzelnen Biotests noch nach Betrachtung der gesamten biologischen Aktivität gefunden (Abb. 3.18).

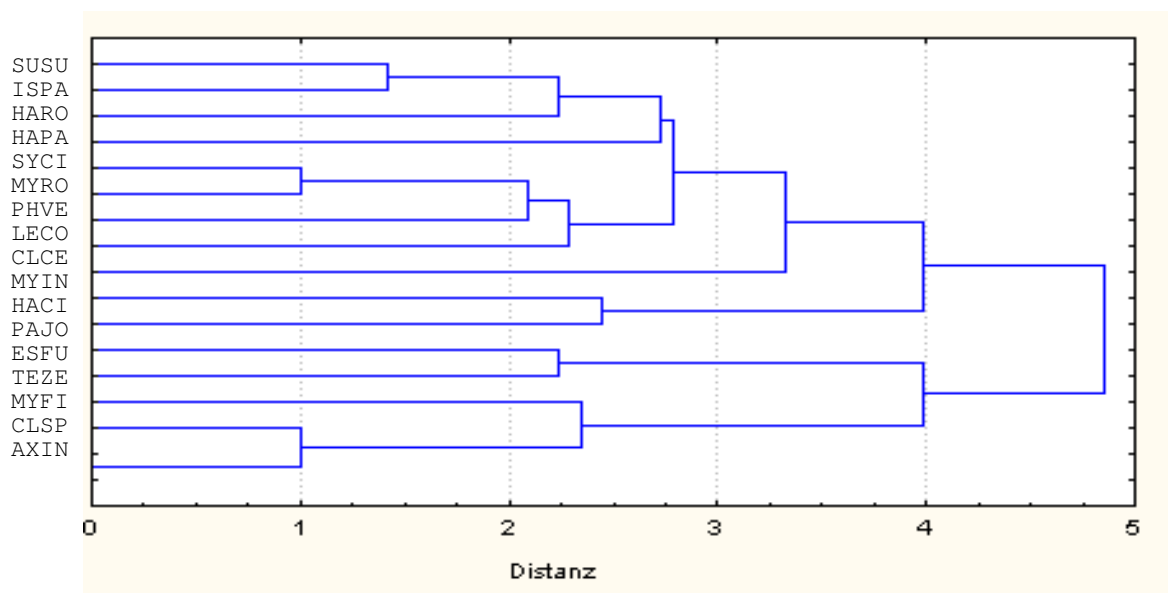


Abbildung 3.18: Clusteranalyse der biologischen Aktivität. Abkürzungen der Schwammnamen wie in Tabelle 2.1 (S. 23) angegeben.

In Versuchen von Uriz et al. (1992) traten antimitotische und cytotoxische Wirkung stets gemeinsam auf und waren am stärksten in krustenbildenden Porifera-Arten. Diese Aktivitäten schienen, genauso wie die antibakterielle Aktivität, unabhängig von der Taxonomie zu sein. Im Gegensatz dazu korrelierten fungizide und antivirale Wirkung mit der Klassifizierung und dominierten, gemeinsam mit der antimikrobiellen Aktivität, bei aufrecht wachsenden Schwämmen (Uriz et al. 1992). Außerdem konnten Uriz et al. (1992) vor allem in Kieselschwämmen cytotoxische, antimitotische und antibakterielle Aktivität nachweisen, während Hornschwämme verstärkt antivirale Substanzen enthielten. Unter welchen Voraussetzungen solche Beziehungen auftreten, ist unklar. Eindeutig ist jedoch, dass diese Korrelationen sich nicht verallgemeinern lassen. Vielmehr sollte populations- und standort-spezifisch immer neu geprüft werden, ob Zusammenhänge zwischen biologischer Wirkung und

Schwammcharakteristika bestehen. Vor diesem Hintergrund wurde bei *Leucosolenia complicata* (Calcarea) und *Cliona ciliata* (Demospongiae) versucht, mögliche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen Lebensweise, taxonomischen und morphologischen Kriterien und der biologischen Aktivität bzw. des Metabolismus herauszufinden. Diese beiden Arten wurden ausgewählt, weil sie die für Kalk- und Kieselschwämme des untersuchten Habitats typischen Merkmale aufweisen (Tab. 3.23). Während es sich bei *C. celata* um eine große, ausdauernde Art mit deutlicher Gliederung in Pinacoderm und Mesohyl handelt, ist *L. complicata* ein kleiner, durch saisonales Wachstum gekennzeichneter Schwamm ohne ausgeprägtes Mesohyl. Ausdauernde Arten müssen sich über einen längeren Zeitraum in ihrem Lebensraum behaupten, während einjährige Arten saisonal bedingt den Winter auf wenige Zellen beschränkt in einem Ruhezustand überdauern und im Frühjahr wieder auswachsen (vgl. Kapitel 1.1). Dieser Lebenszyklus stellt andere Anforderungen an den Metabolismus. Vermutlich ist daher auch der Gehalt an extrahierbaren Naturstoffen unterschiedlich. *L. complicata* enthält viele Mikroorganismen, die möglicherweise zur Stabilisierung des Skeletts und zur Unterstützung der Abwehrmechanismen angereichert werden. Bei großen Arten spielen die Bakterien eine untergeordnete Rolle (vgl. Kapitel 3.5). Biologische Aktivität ist in beiden Arten vorhanden. Somit wurde nachgewiesen, dass die bisher in der Naturstoffforschung unzureichend untersuchten Kalkschwämme in gleichem Maße über aktive Sekundärmetaboliten verfügen wie Kieselschwämme. Die Ergebnisse dieser Gegenüberstellung erlauben die Erläuterung einiger Zusammenhänge, die sich nicht verallgemeinern lassen, jedoch für einige Arten durchaus zutreffen.

Tabelle 3.23: Vergleich zwischen *Cliona celata* und *Leucosolenia complicata*.

Merkmal	<i>Cliona celata</i>	<i>Leucosolenia complicata</i>
Chemisches Profil	metabolitenreich	metabolitenarm
Metabolitenkonzentration	hoch	niedrig
Intraspezifische Variabilität	gering	gering
Menge assoziierter Bakterien	mittel	sehr hoch
Assoziierte Makroorganismen	vor allem Ophiuroiden	ausschließlich Rotalgen
Biologische Aktivität	sehr hoch (Toxizität) schwach (antibakterielle & enzyminhibitorische Wirkung)	hoch (toxische & antimikrobielle Wirkung)

3.4 Chemie einzelner Schwammarten

Wie in Kapitel 3.1 dargestellt, wurde die Metabolitenzusammensetzung chemisch und biologisch interessanter Schwammarten (*Isodictya palmata*, *Phakellia ventilabrum* und *Myxilla fimbriata*) genauer untersucht. Die Isolierung und Strukturaufklärung der charakteristischen Hauptsignale führte zur Identifikation verbreiteter Naturstoffe.

3.4.1 *Isodictya palmata*

Im Rohextrakt wurden drei UV-absorbierende Substanzen bei einer Retentionszeit von $t_R=10,2$ min, $t_R=17,4$ min und $t_R=19,6$ min detektiert. Die Auswahl der zu isolierenden Metaboliten (Tab. 3.24) erfolgte nach dem Vergleich der Signale in der Butanol- und Wasserfraktion (Abb. 3.19).

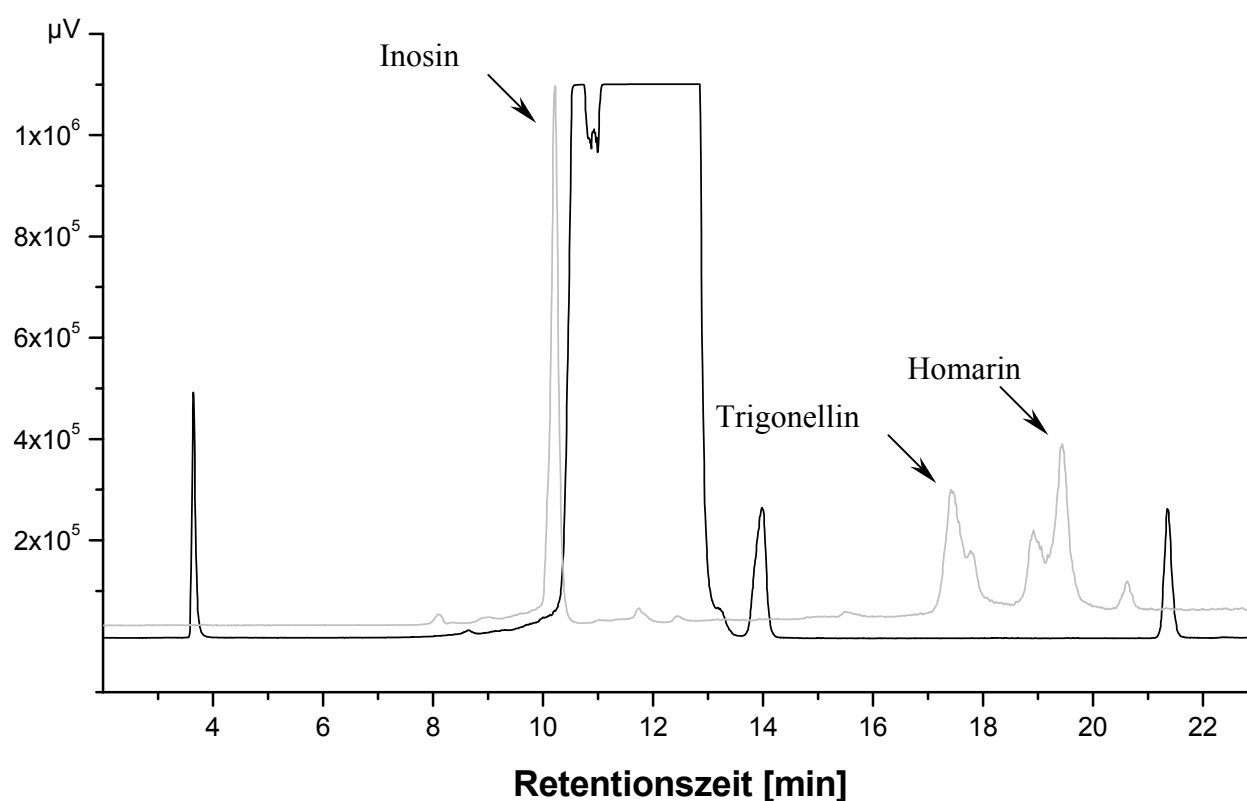


Abbildung 3.19: Chromatogramm der Butanolfraction von *Isodictya palmata*. Streulicht-detektor=schwarz und UV-Absorption=grau. (Säule: Diol Kromasil RP18 (4.6 x 250 mm, 7 µm), Gradient: 100% ACN für 25 min, 50% H₂O/ACN 30 min, 50% MeOH/H₂O 40 min, 100% MeOH 45 min. Flußrate: 1 ml/min).

Tabelle 3.24: Hauptmetaboliten aus *Isodictya palmata* (t_R =Retentionszeit).

Fraktion	Menge [mg]	t_R [min]	Masse	Summenformel	Substanz
Wasserphase/Diol_1	10	10,2	268	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	Inosin
Wasserphase/Diol_3	26	13,9	158		
Butanolphase/LH20_13/Diol_6	4	17,4	137	$C_7H_7NO_2$	Trigonellin
Butanolphase/LH20_13/Diol_8	5,2	19,6	137	$C_7H_7NO_2$	Homarin
Butanolphase/LH20_16-18/Diol_2	13,3	21,2			

Die Substanzen ISPAWD3 und ISPABL16-18D2 konnten mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht aufgeklärt werden. ISPAWD3 ließ sich nicht vollständig aufreinigen. Die NMR-Spektroskopie deutet an, dass ein Gemisch aus mindestens zwei Komponenten vorliegt. Bei ISPABL16-18D2 handelt es sich um eine Substanz, die in vielen Schwämmen vorkommt und aus *Clathrina* sp., *Cliona celata* und *Myxilla fimbriata* isoliert wurde. Abgesehen von den beiden charakteristischen 1H -Triplets ergaben die NMR-Experimente keine auswertbaren Signale, weshalb die Aufklärung erfolglos abgebrochen werden musste. Da diese Substanz in so vielen Proben vorkommt, könnte es sich sowohl um einen ubiquitären Stoff handeln als auch um eine Verunreinigung, die durch die Aufarbeitung eingetragen wurde. Die nachfolgenden Tabellen 3.25 bis 3.27 geben die Daten der NMR-Experimente wieder, die zur Identifizierung der Substanzen herangezogen wurden.

Tabelle 3.25: NMR-Daten von Inosin (**1**; Abb. 3.3 (S. 36), δ =chemische Verschiebung in ppm). Zur Auswertung der Daten siehe Abb. 3.20 (S.82).

Position	δ (^{13}C)	δ (1H)	Multiplizität	COSY	$^1H, ^{13}C$ -HMBC
1	156,9	-----	C	-----	-----
2	148,5	-----	C	-----	-----
3	146,2	8,07 (s)	CH	-----	1, 2, 5 (w)
4	139,1	8,32 (s)	CH	-----	1 (w), 2, 5
5	124,5	-----	C	-----	-----
6	87,7	5,85 (d)	CH	8	2, 4, 8, 9
7	85,9	3,94 (m)	CH	9, 10	8, 9
8	74,3	4,47 (q)	CH	6, 9, 11	6
9	70,5	4,13 (m)	CH	7, 8, 12	6
10	61,5	3,62/3,55	CH ₂	7, 13	-----
11	-----	5,62 (d)	OH	8	6, 8
12	-----	5,36 (d)	OH	10	7, 8
13	-----	5,24 (t)	OH	9	7, 10
14	-----	5,09 (s)	OH	-----	-----

Tabelle 3.26: NMR-Daten von Homarin (**3**; Abb. 3.3 (S. 36); δ =chemische Verschiebung in ppm). Zur Auswertung der Daten siehe Abb. 3.20 (S.82).

Position	δ (^{13}C)	δ (^1H)	Multiplizität	COSY	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC
1	161,0	-----	C	-----	-----
2	156,0	-----	C	-----	-----
3	144,9	8,41 (t)	CH	5, 6	2, 4
4	144,3	8,72 (d)	CH	6	2, 3, 6, 7
5	125,3	7,90 (d)	CH	3	1, 2, 6
6	124,7	7,84 (t)	CH	3, 4	4, 5
7	45,7	4,29 (s)	CH ₃	-----	2, 4

Tabelle 3.27: NMR-Daten von Trigonellin (**4**; Abb. 3.3 (S. 36); δ =chemische Verschiebung in ppm). Zur Auswertung der Daten siehe Abb. 3.20 (S.82).

Position	δ (^{13}C)	δ (^1H)	Multiplizität	COSY	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC
1	161,9	-----	C	-----	-----
2	145,9	9,18 (s)	CH	-----	1, 3, 4, 5, 7
3	144,4	8,84 (d)	CH	6	2, 4, 6, 7
4	143,9	8,74 (d)	CH	6	1, 2, 3, 6 (w)
5	140,5	-----	C	-----	-----
6	126,6	7,99 (t)	CH	3, 4	3, 5
7	47,5	4,35 (s)	CH ₃	-----	2, 3

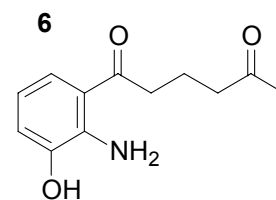
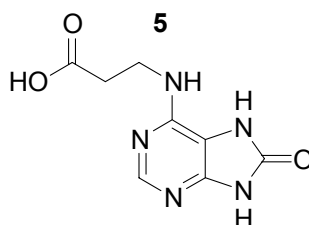
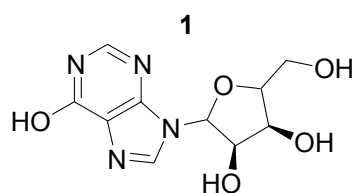
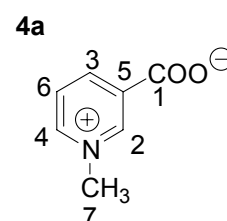
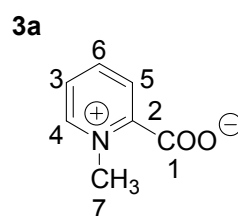
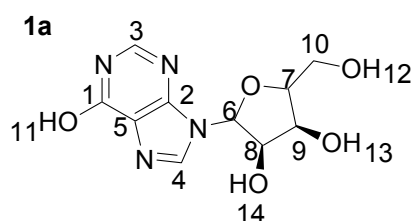


Abbildung 3.20: Auswertung der NMR-Messdaten von Inosin (**1a**), Homarin (**3a**) und Trigonellin (**4a**) und aus Schwämmen der Gattung *Isodictya* isolierte Metaboliten: Inosin (**1**), ein weiteres Nucleosid (**5**), Erebusinone (**6**).

Chemische Studien der Gattung *Isodictya* beschränkten sich bisher auf die antarktische Art *Isodictya erinacea* (Munro & Blunt 1998). Moon et al. (1998) isolierten ebenfalls Nucleoside (**1**, **5**) und beschrieben Erebusinon (**6**) als biologisch aktives Pigment (Abb. 3.20).

Die beiden Pyridinalkaloide Homarin (N-Methyl-pyridin-2-carboxylat, **3**) und Trigonellin (N-Methylnicotinsäure, **4**) wurden bereits in Kapitel 3.1 als in Nordseeschwämmen verbreitete Metaboliten beschrieben (siehe Abb. 3.3). Beers (1967) wies Homarin (**3**) und Trigonellin (**4**) in zahlreichen marinen Crustaceen nach, wobei er letzteres seltener und in geringeren Konzentrationen fand. Ihre Funktion als Osmoregulatoren ist umstritten (Beers 1967; Dall 1971). Auch essbare Mittelmeermollusken enthalten Homarin (Polychronopoulos et al. 2001). Biosynthesestudien bei Krebsen zeigten, dass die Synthese von Homarin durch die Injektion von ^{14}C -markiertem Tryptophan induziert werden kann (Dall 1971). Während laut Kikuchi et al. (1995) Homarin in Schnecken enzymatisch durch die Methylierung von Picolinsäure mit S-Adenosyl-L-Methionin gebildet wird, interpretierten Netherton & Gurin (1982) das in der Krabbenmuskulatur aus Glycin gebildete Homarin als Reservoir für Methylgruppen. Die Bildung von Trigonellin läuft vermutlich über Nicotinsäure als Zwischenstufe ab, wie in Pflanzen und Bakterien nachgewiesen wurde (Abb. 3.21). Ausgangsstoffe können Glycerin und Asparaginsäure oder Tryptophan sein (Luckner 1969).

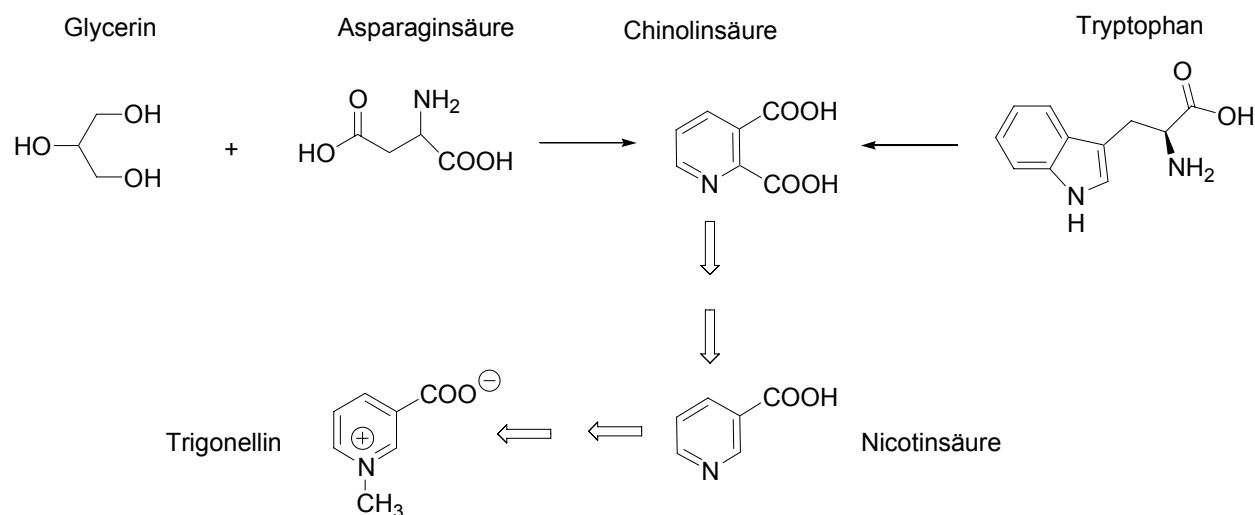


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Biosynthese von Trigonellin (Quelle: verändert nach Luckner 1969).

3.4.2 *Phakellia ventilabrum*

Das HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes zeigte starke Signale bei einer Retentionszeit von $t_R \sim 11$ min, $t_R = 17,6$ min, $t_R = 19,7$ und $t_R = 20,6$ min. Diese wurden gelchromatographisch und mittels präparativer HPLC aus der Wasserphase isoliert (Abb. 3.22 und Tab. 3.28). Neben Homarin (**3**) und Trigonellin (**4**) konnte auch Zooanemonin (**7**) identifiziert werden (Abb. 3.3 und Abb. 3.23).

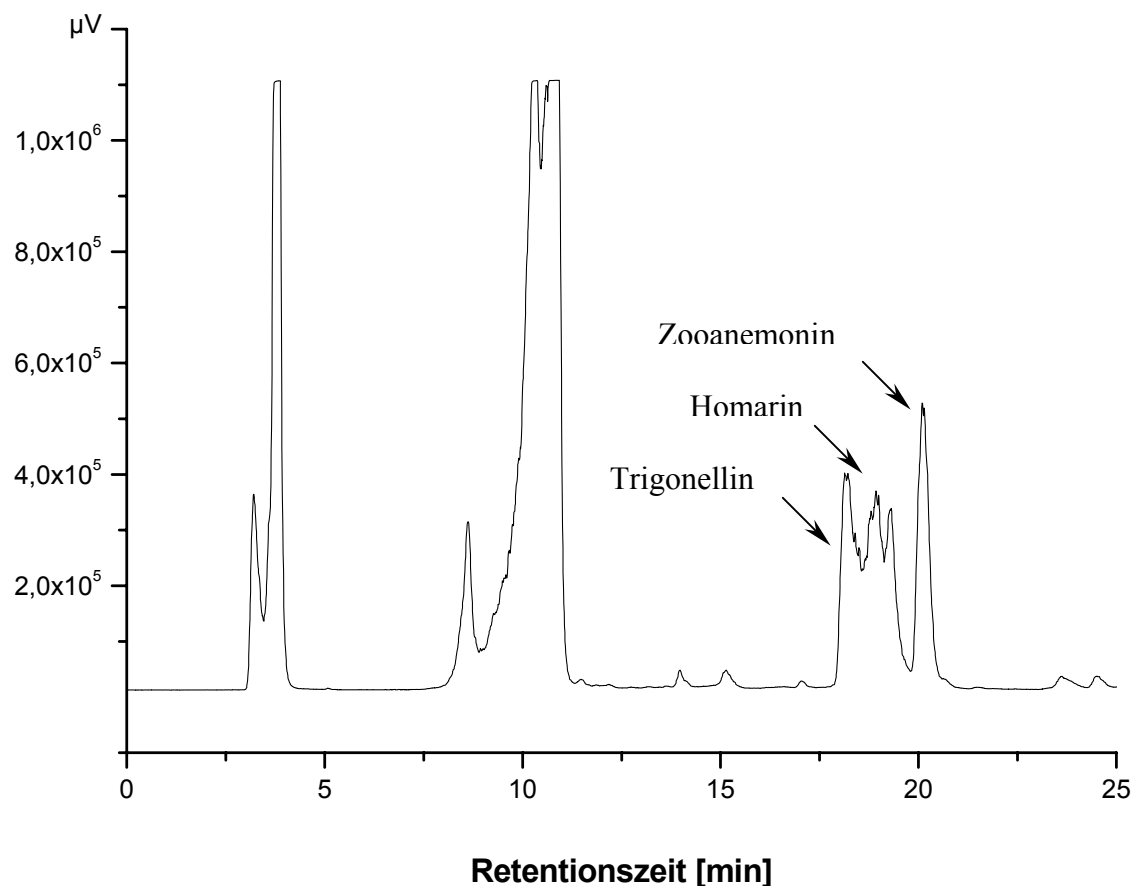


Abbildung 3.22: Chromatogramm des Rohextraktes von *Phakellia ventilabrum* (Säule: Diol Kromasil RP18 (4.6 x 250 mm, 7 µm), Gradient: 100% ACN für 25 min, 50% H₂O/ACN 30 min, 50% MeOH/H₂O 40 min, 100% MeOH 45 min. Flußrate: 1 ml/min).

Tabelle 3.28: Hauptmetaboliten aus *Phakellia ventilabrum* (t_R =Retentionszeit).

Fraktion	Menge [mg]	t_R [min]	Masse	Summenformel	Substanz
Wasserphase/LH20_6/Diol_5	6	~ 11			
Wasserphase/LH20_6/Diol_7	3	17,6	137	C ₇ H ₇ NO ₂	Trigonellin
Wasserphase/LH20_6/Diol_9	4	19,7	137	C ₇ H ₇ NO ₂	Homarin
Wasserphase/LH20_3/Diol_13	6	$\sim 20,6$	155	C ₇ H ₁₁ N ₂ O ₂	Zooanemonin

Tabelle 3.29: NMR-Daten von Zooanemonin (7; Abb. 3.23 (S. 85); δ =chemische Verschiebung in ppm, * auch ^{15}N Verschiebungen angegeben). Zur Auswertung der Daten siehe Abb. 3.23.

Position	$\delta (^{13}\text{C})^*$	$\delta (^1\text{H})$	Multiplizität	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC	$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HMBC
1	(173)	-----	N	-----	-----
2	135,4	8,87 (s)	CH	4, 5, 6, 7	1 (vw), 3 (vw)
3	(166)	-----	N	-----	-----
4	134,5	-----	C	-----	-----
5	119,7	7,33 (s)	CH	2, 6	1 (vw), 3 (vw)
6	35,2	3,77 (s)	CH ₃	2, 5	3
7	33,1	3,74 (s)	CH ₃	2, 4	1
8	33,5	3,23 (s)	CH ₂	4, 5, 9	1
9	167,4	-----	C	-----	-----

Das in *Phakellia ventilabrum* nachgewiesene Imidazol wurde erstmals von Ackerman & Janka (1953) aus *Anemonia sulcata* isoliert und zunächst falsch beschrieben. Ackermann & Lost stellten 1960 die Konstitution richtig und gaben der Verbindung den Namen Zooanemonin (7, siehe Abb. 3.23). Cafieri et al. (1998) stießen bei der Untersuchung der polaren Fraktion eines aus *Agelas dispar* gewonnenen Ethanolextraktes auf Amino-zooanemonin (8). Außerdem isolierten sie, ebenso wie hier für die Nordseeschwämme beschrieben, verschiedene Betaine (Pyridinbetain A und B).

Imidazolalkaloide sind bisher aus Kalkschwämmen der Gattungen *Leucetta* und *Clathrina* bekannt (Edrade et al. 2003). Während zur Naturstoffchemie von *Phakellia ventilabrum* bisher nichts bekannt ist, wurden aus anderen Arten dieser Gattung ca. 50, zum Teil biologisch aktive Naturstoffe isoliert (Blunt & Munro 1998). Neben antimikrobiell wirksamen Bromophakellinen (8) sind die Phakellistatine (cyclische Peptide) als cytotoxische Substanzen mit Antitumor-Wirkung gut untersucht (Schmitz 1994). Das aus *P. ventilabrum* isolierte Zooanemonin zeigte keine enzyminhibitorische oder antibiotische Aktivität.

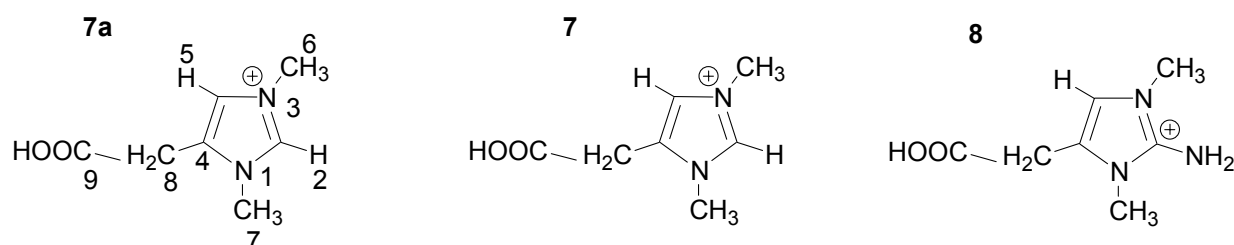


Abbildung 3.23: Auswertung der NMR-Messdaten von Zooanemonin (7a) und Zooanemonin (7) aus *Phakellia ventilabrum* und Amino-zooanemonin aus *Agelas dispar* (8) (Quellen: Ackermann & Lost 1960; Cafieri et al. 1998).

3.4.3 *Myxilla fimbriata*

Dieser Schwamm ist verglichen mit den anderen Nordseearten verhältnismäßig metabolitenreich (Abb. 3.24 und Tab. 3.30), jedoch waren keine Signale im UV-Bereich sichtbar. Die Aufreinigung der Butanolphase mittels Gelchromatographie führte zur Isolierung von Allantoin (**2**, $t_R=8,7$ min). Durch die Trennung der Ethylacetatfraktion mittels präparativer HPLC (Diolsäule) konnte die, bei einer Retentionszeit im Bereich von $t_R \sim 10,5$ min detektierte Substanz als Morpholin (**9**) identifiziert werden (Abb. 3.25). Unter den anderen Hauptsignalen bei $t_R=16-17$ min, $t_R=17,7$ min und $t_R=19,2$ min verbargen sich komplexe Gemische von Substanzen ähnlicher Retentionszeit. So ergab die präparative HPLC des Signals bei $t_R=16-17$ min drei weitere Fraktionen, deren Auftrennung ebenso wie die der beiden anderen Signale ($t_R=16-17$ min, $t_R=17,7$ min) aufgrund der geringen Substanzmenge aufgegeben wurde.

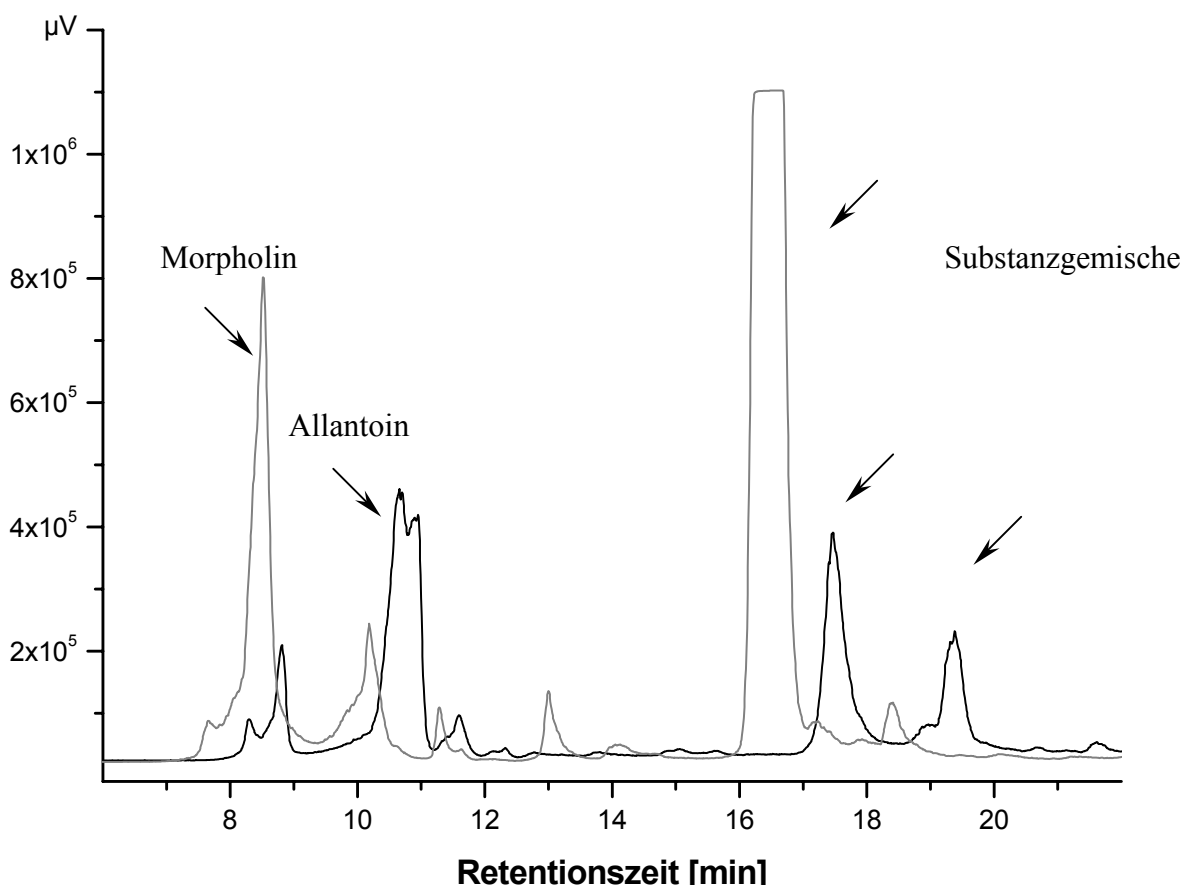


Abbildung 3.24: Chromatogramm der Butanolfraktion (schwarz) und Ethylacetatfraktion (grau) von *Myxilla fimbriata* (Säule: Diol Kromasil RP18 (4.6 x 250 mm, 7 µm), Gradient: 100% ACN für 25 min, 50% H₂O/ACN 30 min, 50% MeOH/H₂O 40 min, 100% MeOH 45 min. Flußrate: 1 ml/min).

Tabelle 3.30: Hauptmetaboliten aus *Myxilla fimbriata* (t_R =Retentionszeit).

Fraktion	Menge [mg]	t_R [min]	Masse	Summenformel	Substanz
Butanolphase/LH20_12	4	10-11	158	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	Allantoin
Ethylacetatphase/Diol_4	16	8,7	88	C ₄ H ₉ NO	Morpholin
Ethylacetatphase/Diol_5	11	17,7			
Butanolphase/LH20_10 Ethylacetatphase/Diol_6	3	19,2			

Tabelle 3.31: NMR-Daten von Morpholin (**9**; Abb. 3.25 (S. 88); δ =chemische Verschiebung in ppm). Zur Auswertung der Daten siehe Abb. 3.25.

Position	δ (¹³ C)	δ (¹ H)	Multiplizität	¹ H, ¹⁵ N-HMBC
1	63,1	3,81 (t)	CH ₂	-----
2	42,4	3,05 (t)	CH ₂	-----
3	-----	9,83 (s)	NH	-----

Tabelle 3.32: NMR-Daten von Allantoin (**2**; Abb. 3.3 (S. 36); δ =chemische Verschiebung in ppm). Zur Auswertung der Daten siehe Abb. 3.25.

Position	δ (¹³ C)	δ (¹ H)	Multiplizität	COSY	¹ H, ¹³ C-HMBC	¹ H, ¹⁵ N-HMBC
1	174,4	-----	C	-----	-----	-----
2	158,2	-----	C	-----	-----	-----
3	157,6	-----	C	-----	-----	-----
4	63,3	5,24 (d)	CH	7	1, 2	-----
5	(146)	10,53 (s)	NH	-----	-----	-----
6	(102)	8,05 (s)	NH	-----	1, 3, 4	5
7	(89)	6,90 (d)	NH	4	1, 2, 4	-----
8	(77)	5,79 (s)	NH ₂	-----	4 (w)	7

Morpholin (Tetrahydro-2*H*-1,4-oxazin) ist als natürlicher Metabolit in Organismen **nicht** bekannt. Es handelt sich um eine Substanz anthropogener Herkunft, die als Korrosionsschutz und in der Gummi-Industrie sowie bei der Synthese von Pestiziden und in der Arzneimittelherstellung zum Einsatz kommt. Viele Morpholinderivate zeigen insektizide, herbizide und fungizide Wirkung (Pollak et al. 2004). Morpholin (**9**) selbst ist sehr reaktiv und als karzinogen bekannt. Chemisch verhält es sich wie ein sekundäres Amin. Eine Studie ergab, dass 1,7 mg/l bzw. 4,1 mg/l Morpholin für aquatische Cyanobakterien (*Microcystis*) und einzellige Grünalgen (*Scenedesmus*) toxisch wirken. Werte für Invertebraten sind nicht bekannt (Quelle:

<http://www.inchem.org>). Das isolierte Morpholin könnte entweder vom Schwamm aus dem Meerwasser angereichert worden sein, oder eine bei der Probenaufarbeitung eingetragene Verunreinigung darstellen.

Auch aus *Myxilla*-Schwämmen wurden bisher nur wenige Metaboliten isoliert (Munro & Blunt 1998). Eine der fünf beschriebenen Substanzen wirkt als Fraßschutz gegen Nudibranchier (siehe Abb. 3.25; Thompson et al. 1982). Außerdem zeigte ein ethanolischer Extrakt aus *Myxilla incrustans* (Mexiko) toxische Wirkung gegenüber Protozoen (Encarnacion et al. 2000), und auch der hier untersuchte Ethylacetatextrakt dieser Art wirkte besonders toxisch gegenüber Tumorzellen (vgl. Kapitel 3.3.2). Über das Vorkommen von Allantoin in Schwämmen gibt es bisher keine Berichte. Es ist als Exkretionsprodukt z.B. bei der Strandschnecke (*Littorina littorea*) und als Stickstoffspeicher in marinen Mikro- und Makroalgen beschrieben (Daguzan & Razet 1971; Thevanathan 2000). Bei *Anabaena* sp. (Cyanobakterium), *Chlorella* sp. und *Scenedesmus* sp. (Grünalgen) stimuliert Allantoin Stoffwechselprozesse. Wird es jedoch in zu hohen Konzentrationen zugesetzt, wirkt Allantoin zunächst inhibitorisch, dann toxisch und löst schließlich nach 4-7 Tagen den Zelltod aus (Czerpak 1983; Czerpak et al. 2003).

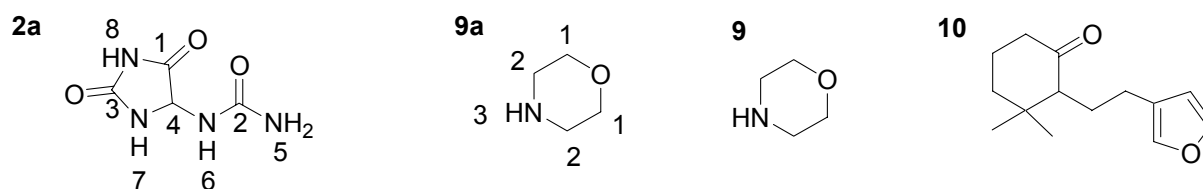


Abbildung 3.25: Auswertung der NMR-Messdaten von Allantoin (**2a**) und Morpholin (**9a**) und aus *Myxilla*-Arten isolierte Substanzen: Morpholin (**9**), eine fraßabschreckende Substanz (**10**) (Quelle: Thompson et al. 1982)

3.5 Chemische und ökologische Studien an *Pachymatisma johnstonia*

Am Beispiel von *Pachymatisma johnstonia* wurde die ökologische Funktion der isolierten Metabolite genauer untersucht. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse deuten an, dass chemische, biologische und ökologische Aspekte in komplexen Beziehungen miteinander interagieren.

3.5.1 Identifizierung der Hauptmetaboliten

Nach dem Vergleich der HPLC-Chromatogramme der Butanol- und Ethylacetatphase wurden die Substanzen mit einer Retentionszeit von $t_R=9,5$ min, $t_R=16-17$ min und $t_R=18,2$ min zur Isolation ausgewählt (Abb. 3.26 und Tab. 3.33). Nur das Signal bei $t_R=16,5$ min zeigte UV-Absorption (250-300 nm). Die Signale bei $t_R=10-11$ min fanden keine Berücksichtigung, da sie aufgrund der oben angeführten Ergebnisse vermutlich auf Substanzen des Primärstoffwechsels (Nucleoside) zurückgehen.

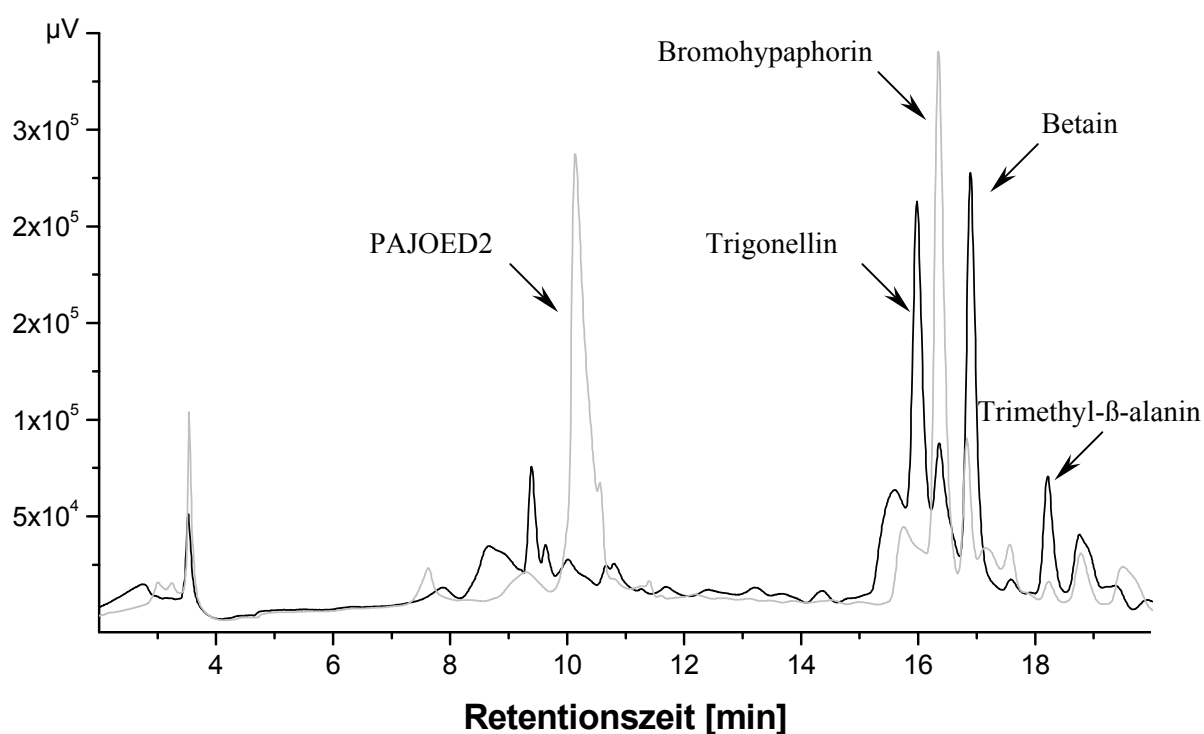


Abbildung 3.26: Chromatogramme der Butanolfraction (schwarz) und Ethylacetatfraction (grau) von *Pachymatisma johnstonia* (Säule: Diol Kromasil RP18 (4,6 x 250 mm, 7 µm), Gradient: 100% ACN für 25 min, 50% H₂O/ACN 30 min, 50% MeOH/H₂O 40 min, 100% MeOH 45 min. Flußrate: 1 ml/min).

Tabelle 3.33: Metaboliten aus *Pachymatisma johnstonia* (t_R =Retentionszeit).

Fraktion	Menge [mg]	t_R [min]	Masse	Summenformel	Substanz
Ethylacetatphase/LH20_7/Diol_2	5	9,7	261	$C_{19}H_{17}O$ $C_{14}H_{17}N_2O_3$	
Butanolphase/Diol5/IV	4	16,0	137	$C_7H_7O_2N$	Trigonellin
Ethylacetatphase/LH20_2	7	16,5	324	$C_{14}H_{17}BrN_2O_2$	L-6-Bromohypahorin
Butanolphase/Diol_5/III	5	17,1	118	$C_5H_{12}NO_2$	Betain
Butanolphase/Diol8	13	18,2	132	$C_6H_{14}NO_2$	N,N,N-Trimethyl- β -alanin

Tabelle 3.34: NMR-Daten von L-6-Bromohypaphorin (**13**; Abb. 3.27 (S. 91); δ =chemische Verschiebung in ppm). Zur Auswertung der Daten siehe Abb. 3.27.

Position	δ (^{13}C)	δ (1H)	Multiplizität	COSY	$^1H, ^{13}C$ -HMBC
1	166,2	-----	C	-----	11
2	137,7	-----	C	-----	-----
3	126,3	-----	C	-----	-----
4	124,2	7,20 (s)	CH	13	2, 3, 9, 10
5	120,7	7,09 (d)	CH	6	3, 9
6	120,2	7,58 (d)	CH	5	2
7	120,0	7,11 (d)	CH	5	2
8	113,1	7,51 (s)	CH	13	2, 3, 6, 9
9	110,2	-----	C	-----	-----
10	78,2	4,13 (d)	CH ₂	11	2
11	66,5	3,61 (s)	CH	9	-----
12	51,4	2,94 (s)	3 x CH ₃	-----	1, 11
13	-----	10,96 (s)	NH	-----	-----

Tabelle 3.35: NMR-Daten von N,N,N-Trimethyl- β -alanin (**11**; Abb.3.27 (S. 91); δ =chemische Verschiebung in ppm). Zur Auswertung der Daten siehe Abb. 3.27.

Position	δ (^{13}C)	δ (1H)	Multiplizität	COSY	$^1H, ^{13}C$ -HMBC
1	170,6	-----	C	-----	-----
2	63,3	3,47 (t)	CH ₂	4	4
3	51,8	3,01 (s)	3 x CH ₃	-----	2
4	30,7	2,43 (t)	CH ₂	2	1, 2

Tabelle 3.36: NMR-Daten von Betain (**12**; Abb.3.27 (S. 91); δ =chemische Verschiebung in ppm). Zur Auswertung der Daten siehe Abb. 3.27.

Position	δ (^{13}C)	δ (1H)	Multiplizität	COSY	$^1H, ^{13}C$ -HMBC
1	163,8	-----	C	-----	-----
2	66,0	3,54 (s)	CH ₂	-----	1, 3
3	51,7	3,13 (s)	3 x CH ₃	-----	2

Die Trennung der Butanolphase führte zur Identifizierung von Trigonellin (**4**), N,N,N-Trimethyl- β -alanin (**11**), und Betain (N,N,N-Trimethylglycin, **12**). Aus der Ethylacetatphase wurde L-6-Bromohypaphorin (**13**) isoliert (Abb. 3.27). PAJOB2 ließ sich nicht ausreichend aufreinigen, um auswertbare NMR-Spektren zu erhalten. Die beobachteten Signale deuten an, dass ein Gemisch aus mindestens zwei Substanzen vorliegt. Bei allen isolierten Verbindungen handelt es sich um bereits bekannte Substanzen. Auch *Pachymatisma johnstonia* enthält Trigonellin (**4**), welches bei vielen Schwämmen eine feste Größe im Stoffwechsel zu sein scheint. L-6-Bromohypaphorin (**13**) wurde erstmalig von Raverty et al. (1977) als bis dahin unbekannte Aminosäure beschrieben. Neben einer Reihe von Glycolipiden und Steroiden wiesen sie außerdem Tryptophan sowie die Pyrimidinbasen Uracil und Thymin in der Butanolphase von *P. johnstonia* nach. Des Weiteren wurden von Warabie et al. (2004) Pachymoside aus *P. johnstonia* isoliert. Diese neuen Glycolipide hemmen die Übertragung von Pathogenen aus Bakterien in die Wirtszelle (Warabie et al. 2004).

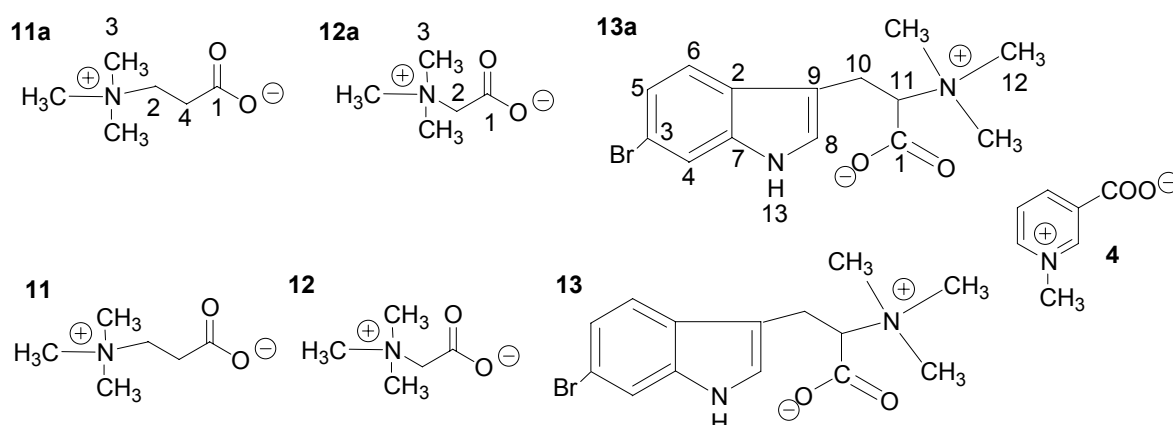


Abbildung 3.27: Auswertung der NMR-Daten von N,N,N-Trimethyl- β -alanin (**11a**), Betain (**12a**), L-6-Bromohypaphorin (**13a**) und aus *Pachymatisma johnstonia* isolierte Hauptmetaboliten N,N,N-Trimethyl- β -alanin (**11**), Betain (**12**), Bromohypaphorin (**13**) Trigonellin (**4**).

Viele der bisher aus *P. johnstonia* isolierten Verbindungen lassen sich aus dem Aminosäure- und Purinstoffwechsel ableiten. Durch den Abbau von Cytosin und Uracil kann im Stoffwechsel β -Alanin gebildet werden, wohingegen Mikroorganismen in der Lage sind, β -Alanin aus Asparaginsäure zu synthetisieren (Luckner 1969; Karlson 1994). Die Möglichkeit der Biosynthese von Trigonellin aus Tryptophan wurde bereits in Kapitel 3.4.1 (Abb. 3.21) erläutert. Methylierte Aminosäuren sind sowohl im Tier- und Pflanzenreich als auch bei Mikroorganismen weit verbreitet. Ist der Stickstoff durch die Methylierung quartär geworden, so spricht man von Betainen. Einige trimethylierte Verbindungen sind in Abb. 3.29 zusammengestellt. Alle in den Verbindungen enthaltenen Methylgruppen stammen aus dem Methionin (Luckner 1969). Wie

hier gezeigt, ist die Bildung von Betain aus Serin oder Glycin möglich (Abb. 3.28). Auch im Purinstoffwechsel ist Glycin von Bedeutung. Purine sind bei allen Lebewesen Bestandteil der Nucleinsäuren und besitzen im Primärstoffwechsel als energiespeichernde und energieübertragende Verbindungen besondere Bedeutung. Darüber hinaus dienen sie im Sekundärstoffwechsel als Ausgangsprodukte zahlreicher Naturstoffe. Pflanzen synthetisieren aus Xanthin und Hypoxanthin, die als Zwischenprodukt im Purinabbau entstehen (vgl. Abb. 3.4), Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin) und Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin). In Mikroorganismen werden Purine zu antibiotisch wirkenden Nucleosiden umgebaut (vgl. Nucleosid-Antibiotika Kap. 3.3.3). Auch in Schwämmen kommen methylierte Purine mit und ohne antibiotische Wirkung vor, so z.B. das in Abb. 1.13 dargestellte Toyomycin (**17**). Diese in Astrophorida (zu dieser Gruppe gehört auch *P. johnstonia*), Hadromerida und Poecilosclerida gefundene Substanz wurde ebenfalls als Verbindung mikrobieller Herkunft beschrieben (Luckner 1969).

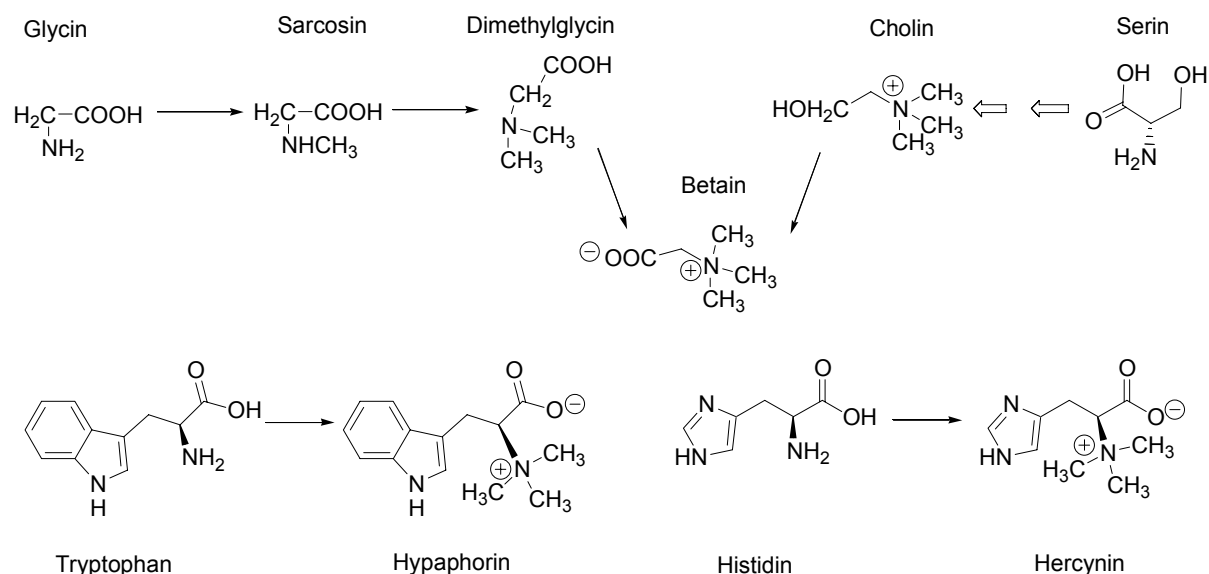


Abbildung 3.28: Aus Aminosäuren synthetisierte methylierte Verbindungen (Luckner 1969).

Die aus den hier untersuchten Nordseeschwämmen isolierten Substanzen lassen sich demnach von sehr ursprünglichen Metaboliten und Synthesewegen ableiten. Auffällig ist, dass viele der gezeigten Biosynthesewege bisher als für Mikroorganismen typisch beschrieben wurden. Die aus *Pachymatisma johnstonia* isolierten Metaboliten wurden aber nur in den Extrakten der Schwammzellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse, zusammen mit den Hinweisen aus der Literatur, deuten an, dass Schwämme dieselben Stoffwechselwege nutzen wie Bakterien. Diese Hypothese würde auch erklären, warum so häufig Unklarheit über die wahre Herkunft der isolierten Naturstoffe herrscht.

3.5.2 Variabilität

Die Metabolitenkomposition der Schwammextrakte unterschiedlicher Standorte sowie verschiedener Schwammpartitionen bewachsener und unbewachsener *Pachymatisma*-Individuen wurde verglichen. Die HPLC-Analyse aller Rohextrakte lieferte ein ähnliches Metabolitenprofil (Abb. 3.29a-c). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Standorten (Hälterung eingeschlossen) waren genauso gering wie die Differenzen zwischen unbewachsenen und bewachsenen Schwämmen.

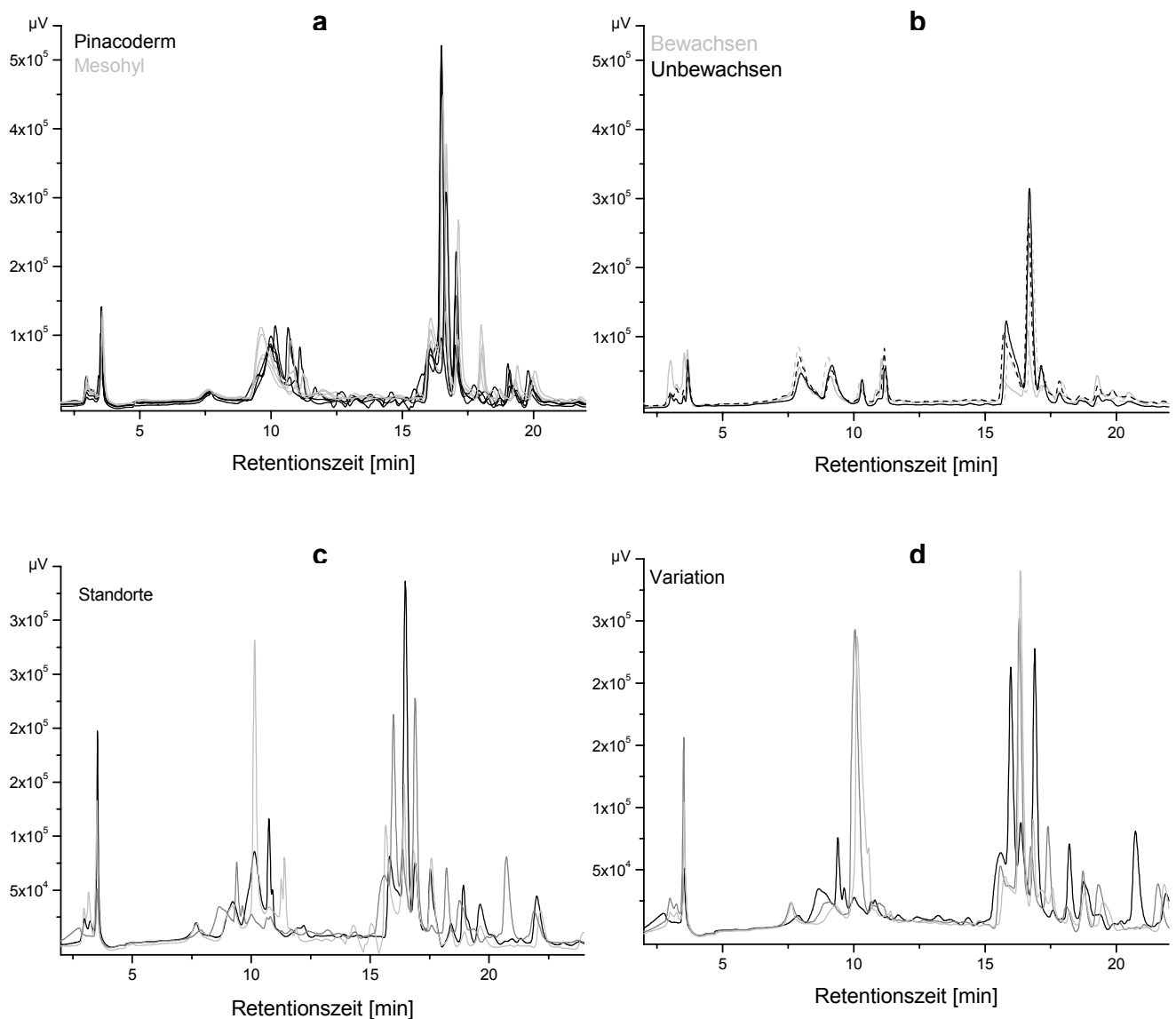


Abbildung 3.29: Qualitativer Vergleich der Metabolitenkomposition zwischen (a) Pinacoderm und Mesohyl, (b) unbewachsenen und bewachsenen *Pachymatisma johnstonia*. Pro Ansatz sind Chromatogramme von Pinacoderm und Mesohyl dargestellt (durchgezogene und gestrichelte Linie). Metabolitenprofil von *Pachymatisma johnstonia*-Individuen (c) verschiedener Standorte Red Nev, Start Point, Bourgh Head (schwarz) und in der Hälterung (grau), (d) individuelle Variabilität (n=3).

Die Metabolitenmuster der Außenschicht und des Schwamminneren unterschieden sich ebenfalls nur unwesentlich voneinander. Im Allgemeinen war die individuelle Variabilität (Abb. 3.29d) so groß, dass kein Einfluss der betrachteten Faktoren beobachtet werden konnte.

Ein quantitativer Vergleich der Rohextrakte von Individuen verschiedener Standorte zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die natürliche Metabolitenkonzentration reichte von 27 mg bis 53 mg. Die Schwämme enthielten durchschnittlich 43,4 mg/ml organische Substanz und 0,36 mg/ml L-6-Bromohypaphorin. Wie die Fehlerbalken verdeutlichen, war die individuelle Variabilität größer als die Unterschiede zwischen Schwämmen verschiedener Standorte (Abb. 3.30).

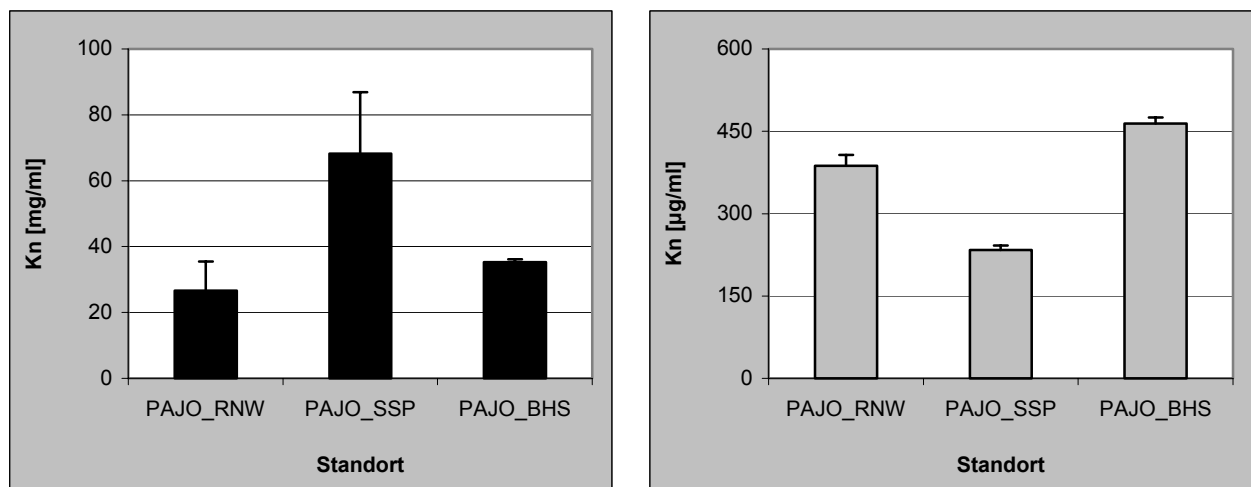


Abbildung 3.30: Variabilität der natürlichen Konzentration ($K_n \pm SD$, $n=3$) der Rohextrakte in mg/ml (schwarz) und von L-6-Bromohypaphorin in µg/ml (grau) bei *Pachymatisma johnstonia*-Individuen verschiedener Standorte (RNW = Red Nev, Westray; SSP = Start Point, Sanday; BHS = Bourgh Head, Stronsay).

Im Laufe der Hälterung in Aquarien auf Helgoland wurden Schwankungen in der Metaboliten-synthese festgestellt (Abb. 3.29c). Bevor auf diese eingegangen wird, folgen einige generelle Bemerkungen zu den Beobachtungen während der Schwammhälterung.

Bei *Esperiopsis fucorum*, *Halichondria panicea* und *Phakellia ventilabrum* setzten bereits wenige Tage nach dem Transfer ins Aquarium Fäulnisprozesse ein, und die Tiere starben. Möglicherweise waren die beim Sammeln zugefügten Verletzungen zu groß oder der Wasserstrom im Hälterungsbecken nicht ausreichend, um eine Regeneration der Schwämme und eine Anpassung an die neuen Verhältnisse zu gewährleisten. *Pachymatisma johnstonia* und *Cliona celata* überlebten in Hälterung, solange der Sedimenteintrag möglichst niedrig gehalten wurde und ein hoher Wasserdurchfluss sowie ausreichend Strömung gewährleistet waren. Einzelne *P. johnstonia* wuchsen auf den PVC-Platten fest. Bei allen *Pachymatisma*- und *Cliona*-Individuen fand eine anhand der veränderten Porenstruktur der Oberfläche beobachtbare

Umgestaltung des Wasserkanalssystems statt. Übereinstimmend mit Osinga et al. (1999) und Uriz et al. (2003) wurde dies als Anpassung an die Hälterungsbedingungen interpretiert und als positiv bewertet. Auch die Zusammensetzung der Bakterienfauna in *Pachymatisma johnstonia* änderte sich. Während in Freilandschwämmen Acidobakterien dominierten, wurden diese im Verlaufe der Hälterung durch Actinobakterien ersetzt (G. Gerds, persönliche Mitteilung). Da trotz der Veränderung in der Bakterienpopulation die Metabolitenkomposition gleich blieb, sind Bakterien bei *P. johnstonia* vermutlich nicht an der Biosynthese der Hauptmetaboliten beteiligt. Die beiden großen, langlebigen Arten tolerieren demnach Veränderungen in der Wasserqualität, dem Lichtklima, der Nährstoffzufuhr, der mikrobiellen Gemeinschaft und dem Fehlen assoziierter Fauna. Ein Zuwachs an Biomasse war bei *Cliona celata* nicht, bei einzelnen *P. johnstonia* nur im Bereich der Anheftungszonen auf den PVC-Platten zu beobachten. Da die Tiere nicht gefüttert wurden, waren die mit dem Meerwasser eingetragenen Nährstoffe möglicherweise für ein Wachstum nicht ausreichend genug. Fröhlich & Barthel (1997) beschrieben die Versorgung mit Silizium als wachstumslimitierenden Faktor für Kiesel Schwämme.

Die Gesamtkonzentration der Metaboliten sank im ersten Hälterungsmonat von durchschnittlich 37 mg auf 30 mg ab, stieg danach wieder an und erreichte bei allen Individuen nach drei Monaten ein Maximum von circa 50 mg. In den folgenden sechs Monaten nahm die Syntheseaktivität wieder ab und sank teilweise unter den Anfangswert. Auch der Gehalt an L-6-Bromohypaphorin wurde kontinuierlich weniger. Während in Freilandschwämmen bzw. vor dem Einsetzen der Tiere ins Aquarium eine mittlere Konzentration von 336 µg ermittelt wurde, sank diese im Laufe der Hälterung auf 102 µg ab (Abb. 3.31). Dies deutet darauf hin, dass die Lebensbedingungen für das Tier nicht optimal waren und sich der Metabolismus veränderte.

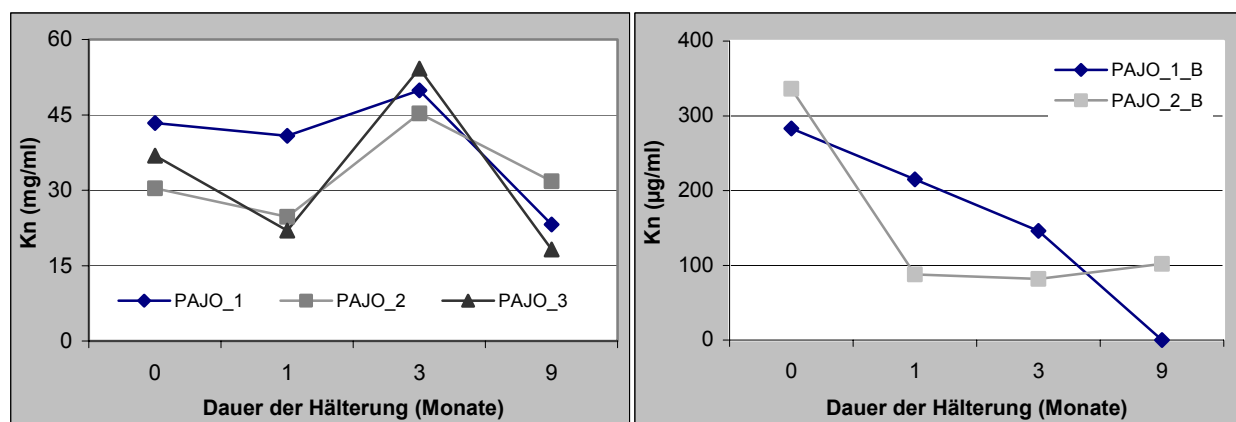


Abbildung 3.31: Veränderungen im Gesammetabolitengehalt (links) und der L-6-Bromohypaphorinkonzentration (rechts) während der Hälterung.

3.5.3 Lokalisierung der Metaboliten

Die Bakterienzellextrakte enthielten den größten Anteil an organischer Substanz (32,11 mg/ml). Der geringste Rohextraktgehalt wurde in den Pinacodermzellen gemessen (2,92-4,87 mg/ml). Die Metabolitenkonzentration in den Schwammzellen sowie im Mesohyl bewachsener und unbewachsener Individuen war ähnlich (24,38 mg/ml; 23,45 mg/ml; 18,15 mg/ml). Verglichen mit epibiontenfreien Schwämmen war der Metabolitengehalt im Pinacoderm bewachsener Tiere bemerkenswert niedrig (4,87 mg/ml und 2,92 mg/ml). Wie der in Abb. 3.32 dargestellte Vergleich bewachsener und unbewachsener Schwämme getrennt nach Pinacoderm, Mesohyl, Bakterien- und Schwammzellen zeigt, wurde die höchste L-6-Bromohypaphorinkonzentration im Mesohyl unbewachsener Schwämme nachgewiesen. In den Bakterienzellextrakten wurde kein L-6-Bromohypaphorin detektiert. Signifikante Unterschiede konnten im Pinacoderm ermittelt werden. Bewachsene Individuen enthielten 42% weniger L-6-Bromohypaphorin (56 µg/ml) als epibiontenfreie Tiere (134 µg/ml).

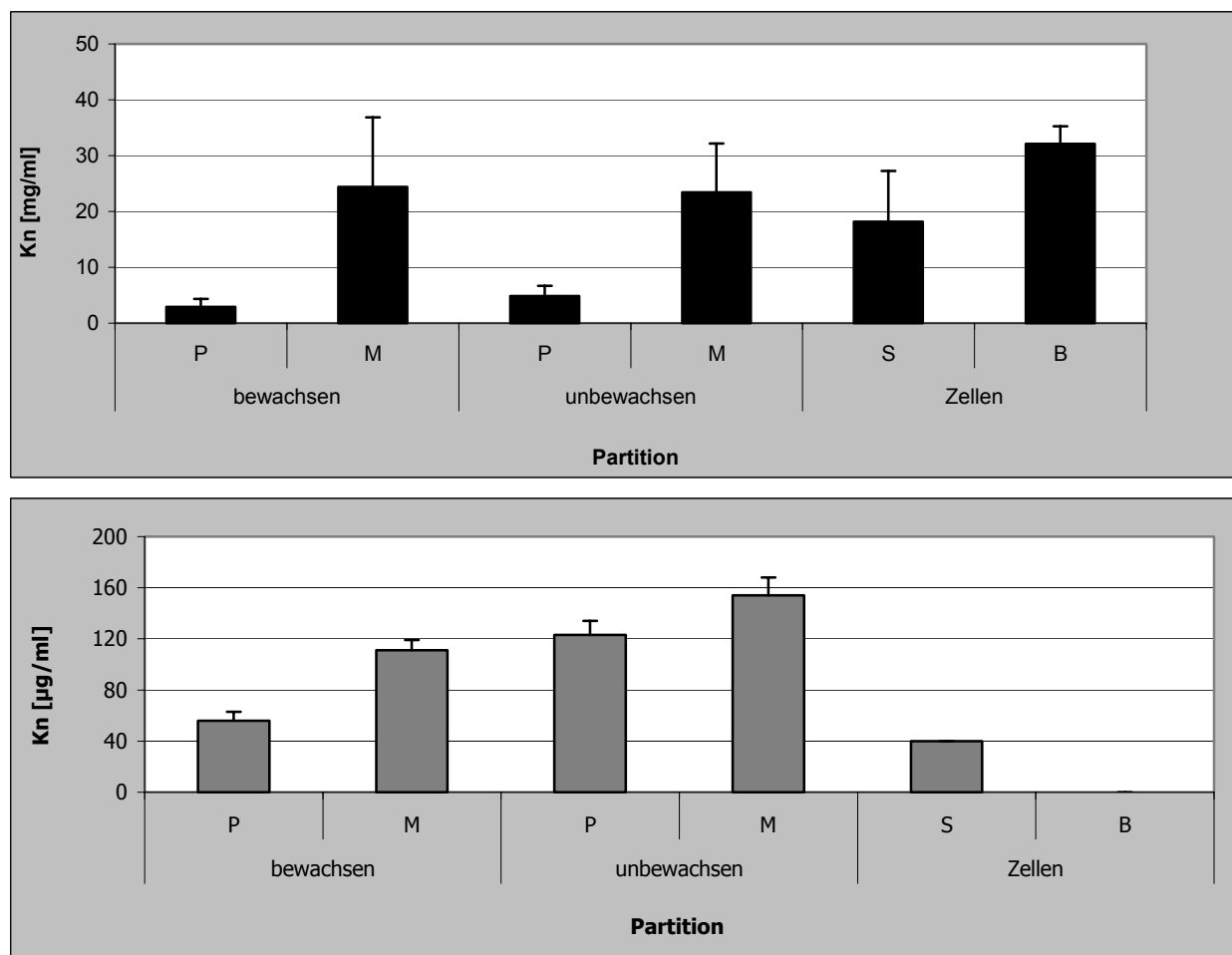


Abbildung 3.32: Variabilität der natürlichen Konzentration ($K_n \pm SD$, $n=3$) der Rohextrakte in mg/ml (schwarz) und L-6-Bromohypaphorin in µg/ml (grau) aus *Pachymatisma johnstonia*-Individuen (P = Pinacoderm, M = Mesohyl, S = Schwamm, B = Bakterien).

Die qualitative Untersuchung mittels LCMS bestätigte das Resultat der Quantifizierung per HPLC. L-6-Bromohypaphorin, N,N,N-Trimethyl- β -alanin und Betain (N,N,N-Trimethylglycin) wurden ausschließlich in Schwammzellen nachgewiesen. Keiner der Metaboliten kam in Bakterienzellextrakten vor. Es wurde oft spekuliert, dass Mikroorganismen die eigentlichen Produzenten der aus Schwämmen isolierten Naturstoffe sind (Kobayashi 1993). Obwohl einige Nachweise erbracht werden konnten, die diese Behauptung stützen (Stierle et al. 1988; Fenical 1993; Oclarit et al. 1996), spielen die in *P. johnstonia* vorkommenden Bakterien keine Rolle bei der Synthese der isolierten Metaboliten. Innerhalb des Schwammes waren alle Substanzen im Mesohylextrakt zu finden. Nur L-6-Bromohypaphorin wurde zusätzlich im Pinacoderm detektiert. Eine Abgabe der Metaboliten an das Meerwasser konnte nicht nachgewiesen werden. Die HPLC-Chromatogramme der C18-Eluat zeigen ein eindeutig unterschiedliches Metabolitenprofil. Die aus den Schwammextrakten bekannten Signale wurden nicht gefunden. Setzt man voraus, dass eine Anreicherung der Metaboliten in der mit der Umwelt in Kontakt stehenden, exponierten Grenzschicht die beste Schutzwirkung erzielt, müssten sich aktive Metaboliten verstärkt im Pinacoderm nachweisen lassen. Die Untersuchungen an *P. johnstonia* bestätigen diese Theorie. Übereinstimmend mit Becerro et al. (1997) wurde die Akkumulation des biologisch aktiven Hauptmetaboliten L-6-Bromohypaphorin im Pinacoderm beobachtet.

3.5.4 Assoziierte Organismen

Wie bereits in Kapitel 3.2 erläutert wird *Pachymatisma johnstonia* von einer Vielzahl an Mikro- und Makroorganismen besiedelt. Besonders häufig sind Mollusca (Abb. 3.33). Auf einzelnen Individuen findet man Bryozoa als dichten Überzug (Abb. 3.34).

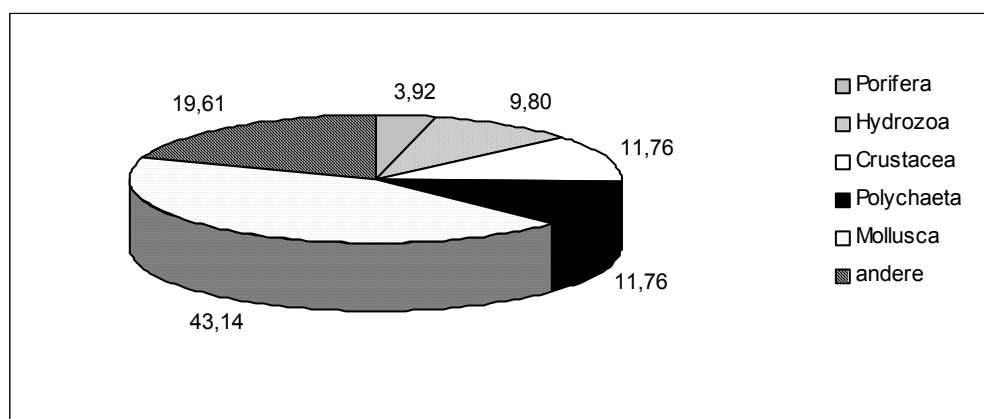


Abbildung 3.33: Zusammensetzung der mit *Pachymatisma johnstonia* assoziierten Fauna. Die Besiedlung mit Bryozoa ist hier nicht angegeben.

Im Zusammenhang mit der Bryozoenbesiedlung wurde eine Schädigung des Pinacoderms und eine erniedrigte L-6-Bromohypaphorinkonzentration festgestellt. Eine Veränderung im Sekundärmetabolismus kann zum direkten Versagen von Abwehrmechanismen führen, die ansonsten die Ansiedlung der Bryozoen verhindern. Außerdem kann ein gestörter Metabolismus auch die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft verändern, was Einfluss auf den Biofilm und die Epibiose haben könnte. Auch Verletzungen des Pinacoderms, hervorgerufen durch Grazer oder Räuber, könnten eine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit bewirken und das Bryozoen-*Fouling* begünstigen. Möglicherweise verursachen die Bryozoen selbst eine Schädigung des Pinacoderms, indem sie durch dichten Wuchs Poren und Oscula verstopfen, und so die Respiration und die Ernährung des Schwammes erschweren oder verhindern. Inwiefern tatsächlich Bakterien in den *Fouling*-Prozess involviert sind, ist noch unklar. Eine negative Korrelation zwischen Bewuchsrate und dem Auftreten antimikrobieller Aktivität könnte wertvolle Hinweise bezüglich der Rolle der Bakterien im *Fouling*-Prozess liefern.

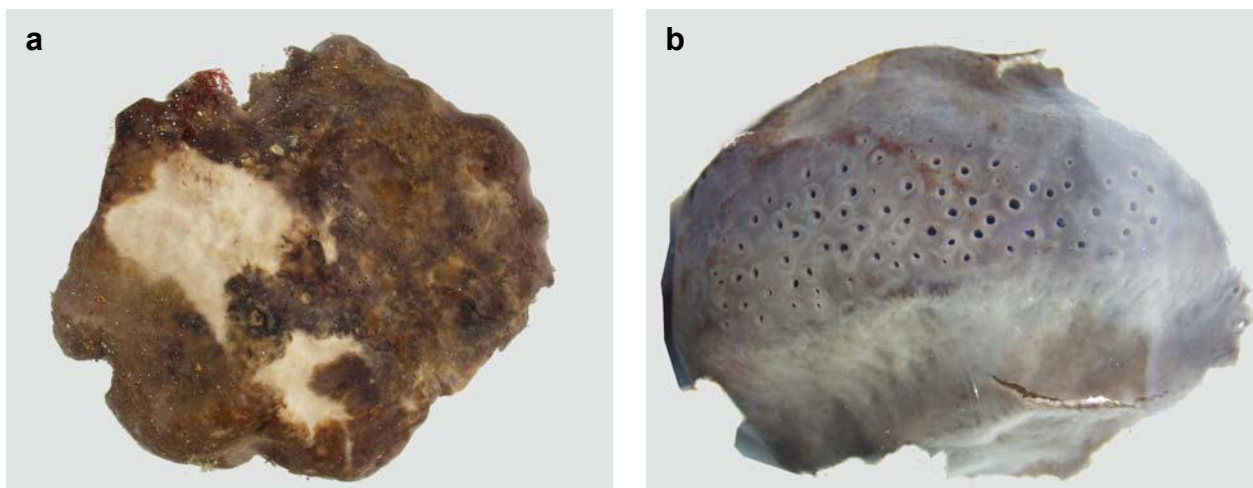


Abbildung 3.34: (a) Bewachsener, (b) unbewachsener *Pachymatisma johnstonia*. Der dichte Bewuchs (links) lässt keine Poren mehr erkennen. Im Vergleich mit dem gesunden Individuum (rechts) sind die Schädigungen des Pinacoderms deutlich sichtbar.

Mit einer Bakteriendichte von $37,8 \times 10^5$ Zellen/cm³ im Mesohyl zählt *P. johnstonia* gemeinsam mit *Rhopaloides odorabile* und *Theonella swinhoei* zu den Schwämmen mit hoher Mikroorganismendichte (Hentschel et al. 2002). Übereinstimmend mit Wilkinson (1978) und Hentschel et al. (2003) wurde im Mesohyl eine größere Bakteriendichte beobachtet als im Pinacoderm. Häufig unterscheidet sich die Bakterienfauna im Schwamm charakteristisch von der des umgebenden Meerwassers. Proteobakterien, Actino- und Acidobakterien sind typische schwammassoziierte Gruppen (Hentschel et al. 2003). Die eigenen Untersuchungen an *P. johnstonia* unterstützen diese Beobachtungen. Der während der Hälterung beobachtete

Austausch der Bakteriengruppen (Acido- gegen Actinobakterien) spricht für die von Hentschel et al. (2003) beschriebene aktive Anreicherung bestimmter Bakteriengruppen aus dem Meerwasser. Die Ergebnisse der Metabolitenuntersuchungen deuten an, dass die Synthese der Hauptmetaboliten bakterienunabhängig verläuft. Dies spricht für den Vorschlag von Hentschel et al. (2002), Bakterien eher als Kommensalen denn als Symbionten zu sehen.

3.5.5 Biologische Aktivität

3.5.5.1 Toxizität

Der Rohextrakt von *Pachymatisma johnstonia* zeigte keine signifikante toxische Aktivität gegen Larven kaltgemäßiger Habitate (*Polyclinum aurantium*, *Halichondria panicea* und *Carcinus maenas*). Die Metaboliten scheinen demnach keine spezifische Aktivität zur Abwehr von Konkurrenzarten zu haben. Nur im *brine-shrimp-assay* waren toxische Effekte zu beobachten (Abb. 3.36). Die Aktivität war in der Butanolphase angereichert. Das aus dieser Fraktion isolierte Trigonellin soll die Ansiedlung von Larven hemmen (Miki et al. 1996) und könnte somit für die beobachtete Toxizität verantwortlich sein. Van de Vyver et al. (1990) testeten methanolische *P. johnstonia*-Extrakte in Versuchen mit Zellsuspensionen des Süßwasserschwamms *Ephydatia fluviatilis*. Während sie *P. johnstonia* als stark cytotoxisch einstufen, zeigte *E. fluviatilis* im MTT-Test keine Aktivität.

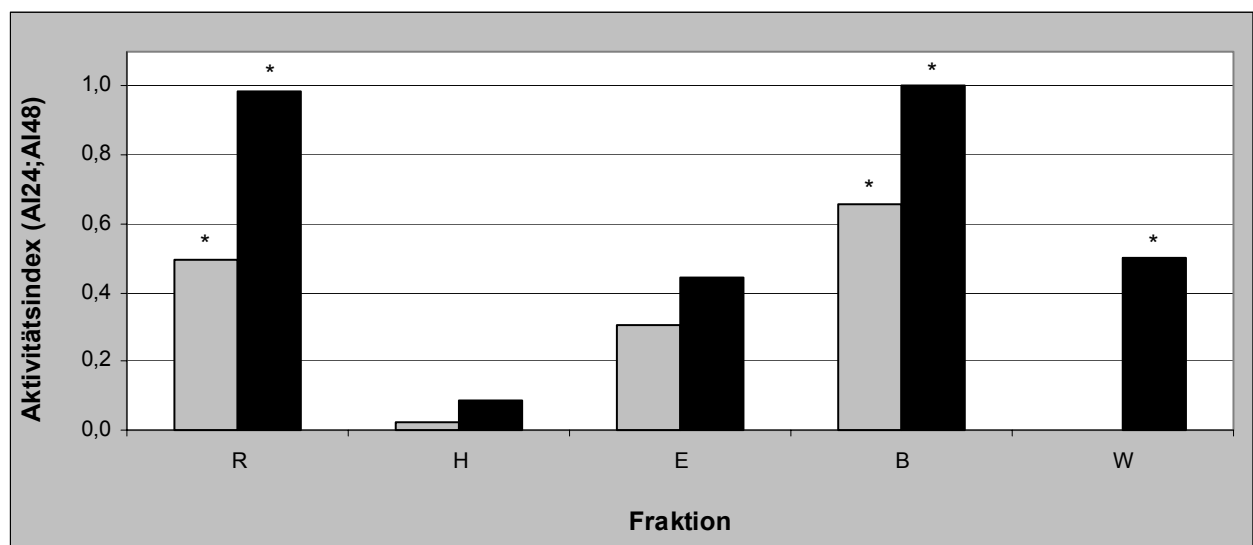


Abbildung 3.35: Toxizität der Fraktionen von *Pachymatisma johnstonia* im *brine-shrimp-assay*. Aktivitätsindex (AI) nach 24 h (grau) und 48 h (schwarz). Signifikante biologische Aktivität ist mit * gekennzeichnet (t-Test, $\alpha=1\%$). R=Rohextrakt, H=Hexan-, E=Ethylacetat-, B=Butanol-, W=Wasserfraktion.

3.5.5.2 Antibakterielle Aktivität

Wie in Kapitel 3.3.3 bereits erwähnt, zeigte *Pachymatisma johnstonia* starke antibakterielle Aktivität. Insgesamt wurden acht der 30 getesteten Bakterienarten gehemmt. Im Gegensatz dazu berichteten Amade et al. (1982) von einer schwachen antimikrobiellen Aktivität in *P. johnstonia*. Diese widersprüchlichen Beobachtungen können durch Unterschiede in der Extraktions- bzw. Testmethode oder durch Variation in der Metabolitenkomposition der Schwämme zustande kommen. Bemerkenswerterweise wurden abgesehen von *Streptomyces purpureus* ausschließlich marine Bakterien gehemmt, wobei die Aktivität gegenüber *Vibrio*-Arten am häufigsten auftrat. Die größten Hemmhöfe traten in den Tests mit *Micrococcus* sp. auf (Abb. 3.36).

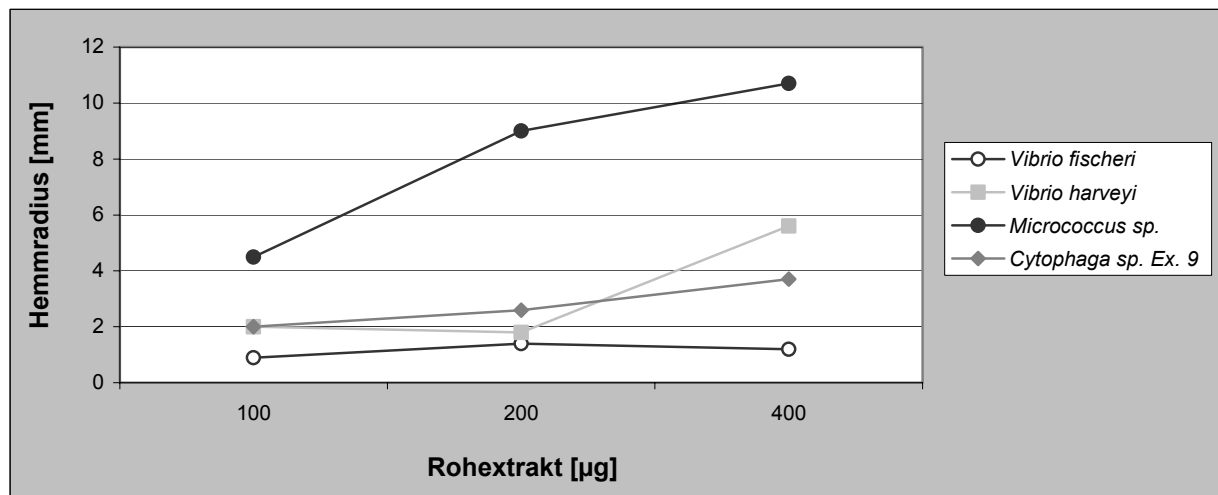


Abbildung 3.36: Antibakterielle Aktivität von *Pachymatisma johnstonia*-Rohextrakten gegenüber verschiedenen Bakterienarten.

Die antimikrobielle Aktivität war in der Ethylacetatphase angereichert. Um die Aktivität eingrenzen zu können wurden die durch eine LH20-Trennung dieser Fraktion erhaltenen Substanzgemische ein weiteres mal separat getestet. Dabei zeigten die aus dem Ethylacetat-extrakt isolierten Reinsubstanzen L-6-Bromohypaphorin und PAJOB2 schwächere antimikrobielle Effekte als andere Fraktionen dieser Phase (Tab. 3.37). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Pachymatisma johnstonia* bisher noch unidentifizierte Naturstoffe mit antibakterieller Wirkung enthält. Außerdem wird deutlich, dass bei der antibiotischen Wirkung andere Substanzen eine Rolle spielen als bei der Larventoxizität.

Tabelle 3.37: Hemmaktivität einzelner Fraktionen aus *Pachymatisma johnstonia* (PAJO).
 ** starke Hemmwirkung, * schwache Hemmwirkung, - keine Hemmwirkung.

Extrakt [µg/Plättchen]	<i>Vibrio fischeri</i>		<i>Vibrio harveyi</i>		<i>Microbacterium barkeri</i>		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
	100	200	100	200	100	200	100	200
PAJO/E L1	-	-	-	-	*	*	*	**
PAJO/E L2	-	-	-	-	-	*	*	**
PAJO/E L3	-	-	-	*	-	*	*	**
PAJO/E L4	**	**	*	**	-	*	*	**
PAJO/E L5	**	**	*	**	*	*	*	**
PAJO/E L6	-	-	*	-	*	*	*	**
PAJO/E L7	-	-	-	-	-	-	*	*
PAJO/E L8	-	-	-	-	*	*	-	-
PAJO/E L9	-	-	*	-	-	-	-	-
PAJO/E L10	-	-	*	-	*	*	*	*
PAJO/E L11	-	-	*	-	-	*	*	*
PAJO/E L13	-	-	*	-	-	-	**	**
PAJO/E L15	**	**	*	**	-	-	*	**
PAJO/E L17	-	-	-	-	-	*	*	*
PAJO/E L19	-	-	-	-	-	*	*	*

3.5.5.3 Enzyminhibition

Wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, beschränkte sich die Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)-Hemmung auf die Butanolphase ($EA_R=35\%$), während die Hexanphase die Enzymaktivität stimulierte ($EA_R=195\%$). Aufgrund des Verlaufs der konzentrationsabhängigen Hemmkurve kann N,N,N-Trimethyl-β-alanin für die im Butanolextrakt beobachtete Wirkung verantwortlich gemacht werden (Abb. 3.38). L-6-Bromohypaphorin und PAJOBD2 verursachten mit $EA_R=2\%$ eine stärkere Hemmung als der bekannte PTK-Inhibitor Piceatannol (6-11%). Beide Substanzen waren bis zu einer minimalen Konzentration von 75 und 37,5 µg/ml aktiv (Abb. 3.32). Erstmals wurde damit die enzymhemmende Wirkung von L-6-Bromohypaphorin nachgewiesen. Zusammen mit 003BD2 können nun zwei weitere aus Schwämmen isolierte Naturstoffe der Liste der PTK-Inhibitoren hinzugefügt werden. Auffällig war, dass die Ethylacetatphase insgesamt keine inhibitorische Wirkung besaß, während zwei aus dieser Fraktion isolierte Substanzen starke Hemmeffekte verursachten. Da diese Beobachtung reproduzierbar war ($n=9$), können Fehler bei der Versuchsdurchführung ausgeschlossen werden. Vermutlich führen Wechselwirkungen zwischen den Metaboliten zur Aufhebung der Aktivität. Neben den Fraktionen und Reinsubstanzen wurde auch die PTK-Aktivität der verschiedenen Schwammpartitionen getestet. Die Hemmwirkung beschränkte sich auf die Schwammzellenextrakte (Abb. 3.38). Außerdem war die Enzyminhibition im Pinacodermextrakt bewachsener Individuen

signifikant geringer als in Schwämmen ohne Bewuchs. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass L-6-Bromohypaphorin als PTK-Inhibitor im Pinacoderm angereichert wird und eine Schutzfunktion zur Abwehr von *Fouling*-Organismen übernimmt.

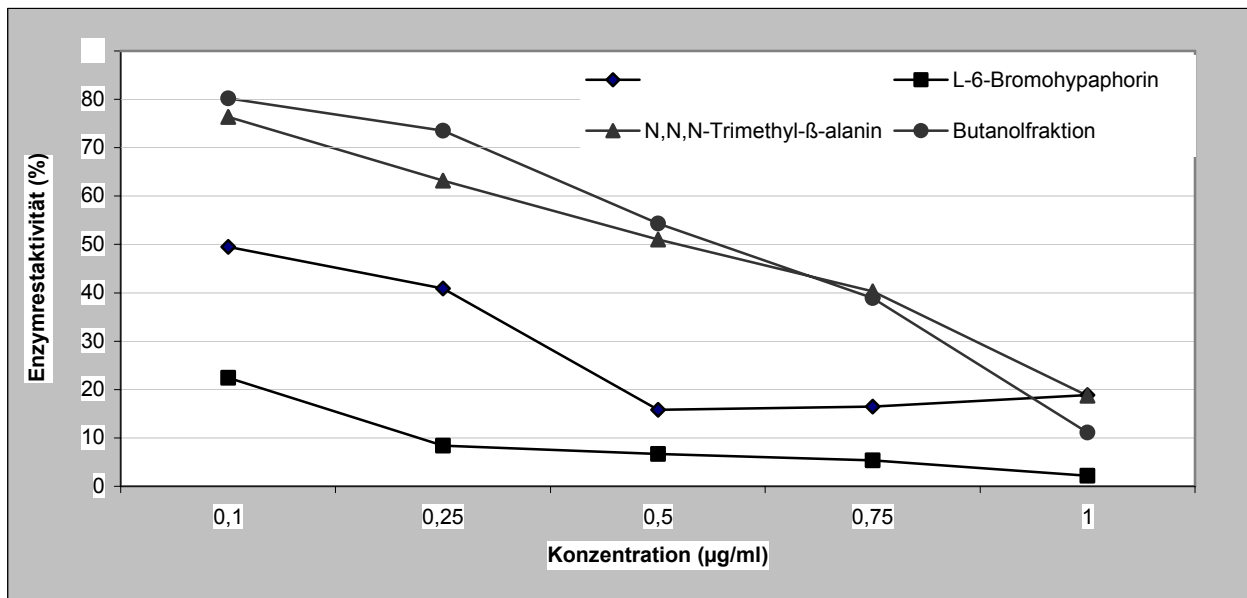


Abbildung 3.37: PTK-Aktivität der Butanolfraktion und der Reinsubstanzen aus *Pachymatisma johnstonia* (n=3) Verdünnungsreihe mit einer Ausgangskonzentration von 1 = 150 µg/ml in den angegebenen Schritten auf 0,1 = 15 µg/ml.

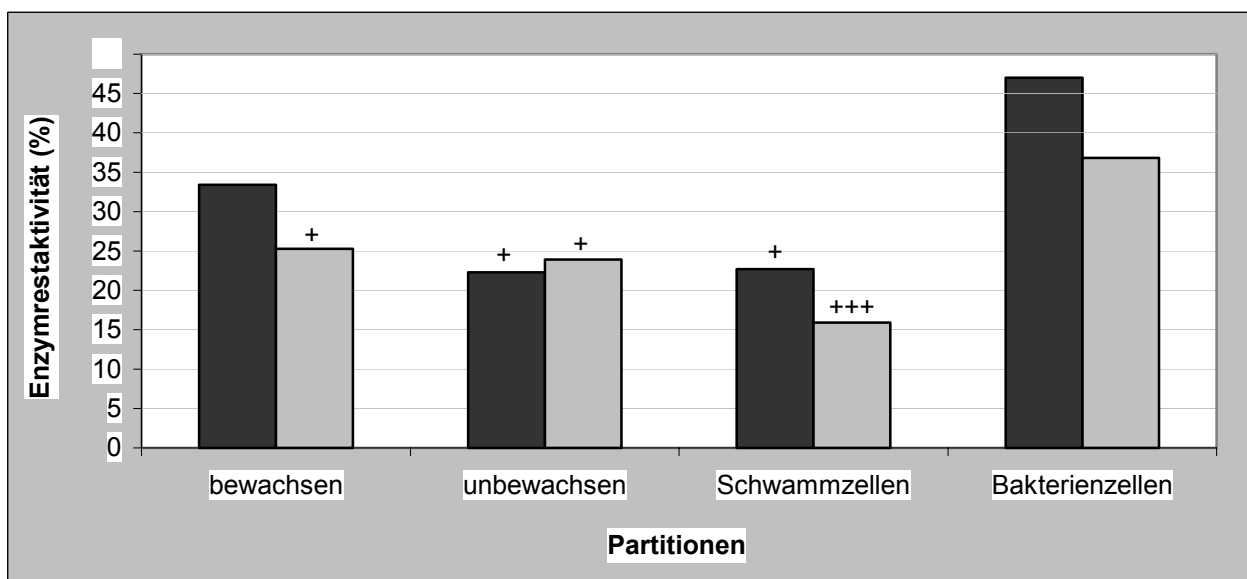


Abbildung 3.38: Enzymrestaktivität im Pinacoderm (schwarz) und Mesohyl (grau). Klassifizierung der Hemmwirkung: +++ stark ($EA_R=0-15\%$) und + schwach ($EA_R=16-30\%$).

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die chemische Analyse von 17 abundanten Nordseeschwammarten zeigte, dass die Metabolitenzusammensetzung und -konzentration standortbedingt nur geringfügig schwanken. Den Großteil der Schwammmetaboliten bilden mittelpolare bis polare Substanzen ohne UV-Absorption. Allgemein scheinen in Nordseeschwämmen aromatische und olefinische Verbindungen seltener vorzukommen als in tropischen Arten. Die Chemie der einzelnen Nordseeschwämme ist oft ähnlich und wird von kleinen, stickstoffhaltigen Molekülen dominiert. Ubiquitär verbreitete, vermutlich phylogenetisch alte Substanzen wie Inosin, Allantoin, Homarin und Trigonellin wurden in zahlreichen untersuchten Arten nachgewiesen. Trigonellin und Homarin üben, wie für andere marine Organismen bereits dokumentiert, auch in den Nordseeschwämmen Schutzfunktion gegen Konkurrenten und *Fouling*-Organismen aus. Die identifizierten Verbindungen weisen darauf hin, dass den mit dem Aminosäure- und Purinstoffwechsel verbundenen Biosynthesewegen eine große Bedeutung in der Naturstoffsynthese der untersuchten Schwammarten zukommt. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, dass auch die Bildung von Imidazolen (aus *Phakellia ventilabrum* isoliert) aus Histidin eng mit dem Purinstoffwechsel verbunden ist. Durch den Abbau von Histidin können wiederum Substanzen entstehen, die als Methylendonatoren in Frage kommen (methylierte Verbindungen, vgl. *Pachymatisma johnstonia*).

Biologische Aktivität wurde anhand von Biotests zur antilarvalen, cytotoxischen, antibakteriellen, enzyminhibitorischen und bewuchshemmenden Wirkung in Extrakten der untersuchten Nordseeschwämme nachgewiesen. Dabei zeigten alle Schwammarten Effekte in mehr als einem Biotest. Diese Untersuchungen bestätigen das Vorkommen biologisch aktiver Substanzen in Schwämmen kaltgemäßiger Habitate und widerlegen damit die Latitudinalhypothese. Unabhängig von der geographischen Breite sind Schwämme weltweit einem selektiven Druck ausgesetzt, der die Entwicklung biologisch aktiver Metaboliten begünstigt. Die Art der Selektionsfaktoren scheint jedoch habitatbedingt unterschiedlich zu sein. Während in wärmeren Gewässern vor allem Prädatoren (Fische) das Überleben der Schwämme beeinflussen, sind in kälteren Gebieten Aufwuchsorganismen und Bakterien von entscheidender Bedeutung. Diese Annahme wird durch die Beobachtung der assoziierten Organismen ebenso unterstützt, wie durch die Tatsache, dass in allen untersuchten Nordseeschwammarten (*Esperiopsis fucorum*, *Phakellia ventilabrum*, *Leucosolenia complicata*, *Cliona celata*, *Pachymatisma johnstonia*) Bakterien nachgewiesen werden konnten. Neben den ökologischen Beobachtungen bekräftigt auch die starke antibakterielle Wirkung der Schwammmetaboliten diese Hypothese. Während Toxizität seltener beobachtet wurde, zeigten viele Schwämme auch enzyminhibitorische

Wirkung. Zusammenhänge zwischen biologischer Aktivität und morphologischen bzw. taxonomischen Kriterien, Lebensweise, Habitatcharakteristika oder assoziierten Organismen waren nicht durch Clusteranalysen aufzudecken. Es konnten jedoch Unterschiede im Metabolitengehalt und der Art der assoziierten Organismen zwischen langlebigen, großen Kieselchwammarten und kleineren, saisonal wachsenden Kalkschwämmen hervorgehoben werden. *Leucosolenia complicata* (Calcarea) ist sowohl qualitativ als auch quantitativ relativ metabolitenarm, biologisch sehr aktiv und mit einer großen Zahl an Bakterien assoziiert. Die Mikroorganismen scheinen für diese Art von größerer Bedeutung zu sein als bei den untersuchten Demospongiae. Einige Kieselschwämme (z.B. *Cliona celata*, *Phakellia ventilabrum*) sind besonders metabolitenreich, enthalten weniger Bakterien und verfügen ebenfalls über biologisch aktive Substanzen. Um diese Beobachtungen in einem ökologischen Zusammenhang zu sehen, sind eingehendere Studien, wie sie mit *Pachymatisma johnstonia* durchgeführt wurden, notwendig.

Die Isolierung der Hauptmetaboliten von *Pachymatisma johnstonia* führte zur Identifizierung der methylierten Substanzen Betain, N,N,N-Trimethyl- β -alanin, L-6-Bromohypaphorin und dem Pyridinalkaloid Trigonellin. Anhand verschiedener biologischer Tests konnte ein Einblick in die Wirkungsweise und Funktion der aktiven Metaboliten gewonnen werden. Die Aminosäure L-6-Bromohypaphorin und eine noch nicht identifizierte Substanz zeigten starke Enzyminhibition gegenüber einer Protein-Tyrosin-Kinase. L-6-Bromohypaphorin wurde im Pinacoderm unbewachsener Individuen in einer höheren Konzentration nachgewiesen als in Schwämmen mit Bryozoenbewuchs, und spielt demnach vermutlich bei der Abwehr von *Fouling*-Organismen eine Rolle. Bakterien wurden als Produzenten der aktiven Substanzen ausgeschlossen. Eine Abgabe der Metaboliten nach außen ist eher unwahrscheinlich. Die Extrakte von *P. johnstonia* zeigten starke antibakterielle Wirkung mit einer Breitbandaktivität, vor allem gegen marine Bakterien. Welche Substanzen für diese Effekte verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Eine Hälterung von *P. johnstonia* war möglich. Ebenso wie *Cliona celata* passte sich der Schwamm an veränderte abiotische und biotische Faktoren an. Verletztes Gewebe wurde regeneriert und Hauptmetaboliten weiter produziert. Die Synthesetätigkeit von *P. johnstonia* schwankte, die biologische Aktivität blieb über neun Monate hinweg erhalten. Durch eine Optimierung der Hälterungsbedingungen könnte die Naturstoffproduktion vermutlich konstant gehalten werden. Mit *P. johnstonia* wurde somit ein gutes Beispiel für die Interaktion zwischen Naturstoffchemie, Ökologie und pharmakologischem Potential bzw. biotechnologischer Nutzbarkeit geliefert.

Bedingt durch das Ziel der Arbeit, einen Überblick über die Chemie und biologische Aktivität der Nordseeschwämme zu gewinnen, wurde weniger Augenmerk auf die Isolierung neuer Strukturen gelegt. Im Zuge von intensiveren Studien wäre eine Optimierung der chemischen Methodik anzustreben. Die Aufklärung der in geringerer Konzentration vorkommenden Substanzen könnte hilfreich sein, um den ersten Eindruck der Metabolitenzusammensetzung zu überprüfen. Außerdem wird aufgrund der Biotestergebnisse die Existenz zahlreicher biologisch aktiver Substanzen, vor allem antibiotischer Wirkstoffe, vermutet, deren Isolierung eine Herausforderung darstellt. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass bisher sämtliche medizinisch genutzten Antibiotika aus Mikroorganismen stammen, Schwämme aber weltweit über ein hohes antibiotisches Potential verfügen. Dadurch stellt sich erneut die Frage, ob Schwämme tatsächlich selbst in der Lage sind, wirksame Substanzen zu produzieren. Diese Ungewissheit zusammen mit der Tatsache, dass alle aus den Nordseeschwämmen isolierten und identifizierten Verbindungen aus Stoffwechselwegen stammen, die bisher als für Mikroorganismen typisch beschrieben wurden, bietet interessante Ansatzmöglichkeiten für weitere Untersuchungen.

Auch wenn Schwämme zu den am besten untersuchten Organismen in der marinen Naturstoffchemie zählen, ist das Wissen im Bereich der chemischen Ökologie noch begrenzt. Um mehr über die Beziehung zwischen Schwämmen und ihrer belebten Umwelt zu erfahren und die Rolle der Naturstoffe dabei aufzudecken, müssen geeignete Untersuchungsmethoden bzw. Biotests etabliert werden. Abbildung 4.1 soll die Bedeutung der Schwämme für ihren Lebensraum und den Menschen hervorheben und die komplexen Zusammenhänge, welche durch die Wirkung der Naturstoffe vermittelt werden, verdeutlichen.

Häufig werden Schwämme als primitive Organismen beschrieben, da sie sich durch das Fehlen eines Nervensystems und anderer Organe von höheren Tieren unterscheiden. Tatsächlich sind diese Lebewesen aber hochentwickelte Spezialisten. Optimal an eine sessile Lebensweise angepasst, bewohnen sie seit Millionen von Jahren erfolgreich vor allem marine Habitate in großer Artendiversität und Abundanz. Aufgrund der Produktion von aktiven Metaboliten zur Abwehr schädlicher Organismen stellen die Schwämme aus menschlicher Perspektive eine wertvolle Ressource dar. Nicht nur aus diesem Grund sollten wir Ihnen mit Respekt begegnen und versuchen, die (Naturstoff-)forschung nachhaltig zu betreiben, die Beeinträchtigung der Tiere auf ein vertretbares Maß zu reduzieren und ihren Lebensraum zu schützen.

***The more researchers learn about
these strangest of strange animals,
the more they want to know***

(aus: SPONGES GET RESPECT Doug Stewart)

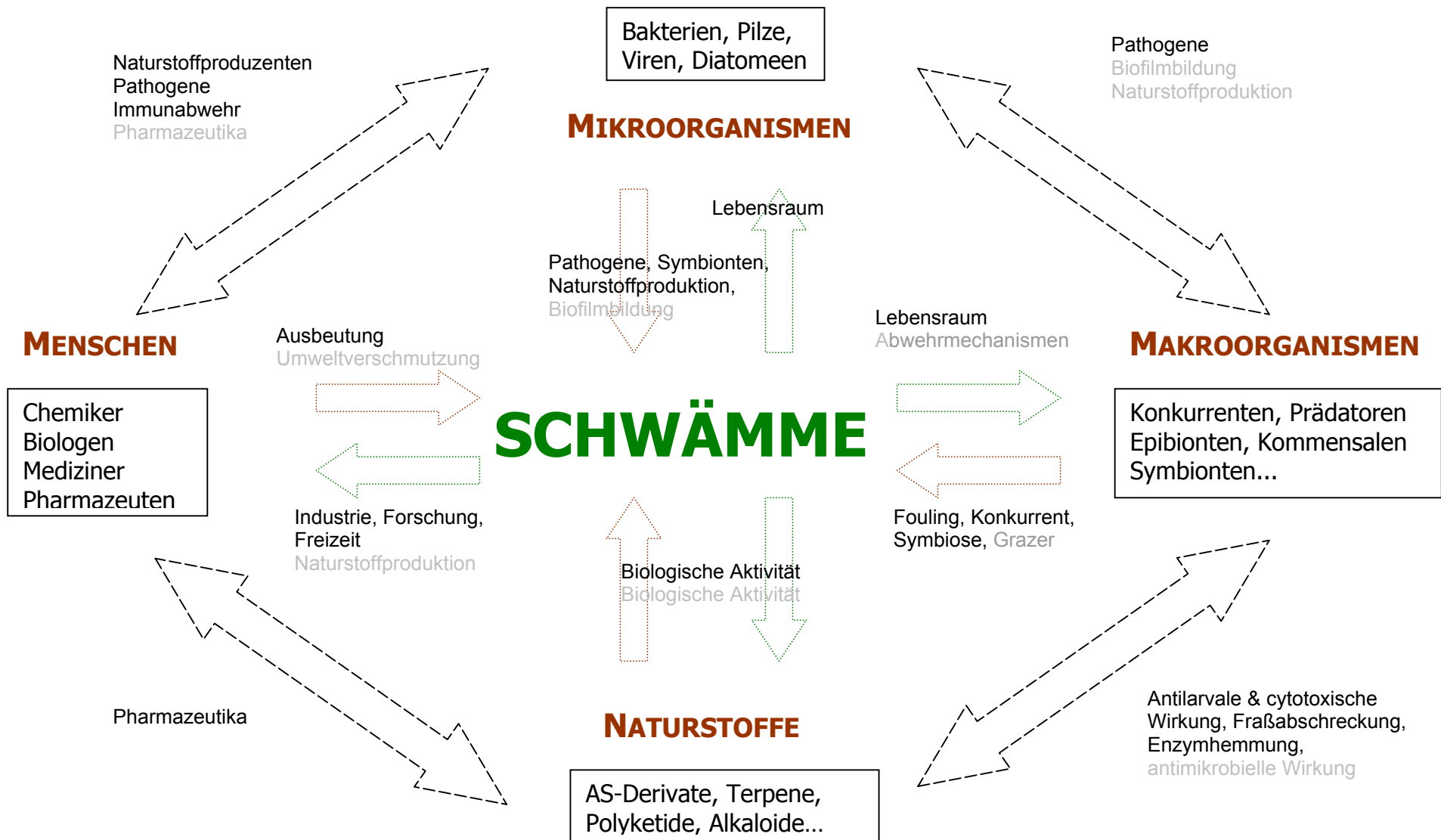


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Beziehung zwischen Schwämmen und ihrer Umwelt im Zusammenhang mit der Naturstoffproduktion. Direkte Beziehungen (schwarz) und indirekte Wirkung (grau).

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Chemische Methoden

5.1.1 Extraktion und Fraktionierung

Die Schwammproben wurden gefriergetrocknet und zerkleinert. Bei Raumtemperatur wurden jeweils 250g Trockensubstanz dreimal mit 500 ml eines Gemisches aus Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 1:1 für 1,5 h (davon 30 min im Ultraschallbad) extrahiert. Die enthaltenen Schwebstoffe wurden abfiltriert, und der Extrakt mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Laborota 4002, Fa. Heidolph) eingeeengt. Von diesem Rohextrakt wurde eine Probe zurückbehalten, der Rest in 250 ml Methanol aufgenommen und gegen 200-400ml *n*-Hexan drei- bis fünfmal ausgeschüttelt. Die Phasen wurden getrennt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die eingeeengte Methanolphase wurde in 200-400 ml Ethylacetat aufgenommen und drei- bis fünfmal gegen 200-400 ml Wasser ausgeschüttelt. Die Wasserphase wurde dann ebenfalls drei- bis fünfmal gegen 200-400 ml wassergesättigtes *n*-Butanol ausgeschüttelt. Die Menge der bei der Fraktionierung verwendeten Lösungsmittel richtete sich nach der erhaltenen Extraktmenge. Anschließend wurden alle Fraktionen am Rotationsverdampfer eingeeengt und über Nacht im Vakuum getrocknet. Während des Extraktionsprozesses wurde das Frisch- und Trockengewicht der Schwammproben sowie die Menge der erhaltenen Fraktionen dokumentiert.

5.1.2 Metabolitenisolierung und –identifizierung

5.1.2.1 Chromatographische Methoden

Gelpermeations-Chromatographie (LH-20)

Die Gelpermeations- oder Ausschluss-Chromatographie wurde unter Verwendung von Sephadex® LH-20 (Pharmacia Biotech, Korngröße 25–100 µm) mit Methanol als Eluent zur Auftrennung von Ethylacetat-, Butanol- und Wasserphasen durchgeführt. Abhängig von der zu trennenden Extraktmenge kam eine große Glassäule mit einem Innendurchmesser von $D_i=80$ mm bei einer Gelbetthöhe von $H=1120$ mm oder eine kleinere Glassäule ($D_i=30$ mm, $H=840$ mm) zum Einsatz. Bei dieser Chromatographiemethode werden die aufgetragenen Substanzen aufgrund ihrer Molekülgröße getrennt. Als stationäre Phase dient Sephadex, ein mit Epichlorhydrin quervernetztes Dextran. Zusammen mit Methanol als mobiler Phase entsteht ein Netzwerk, das die Auftrennung der Probe nach der Molekülgröße bewirkt. Je größer ein Molekül ist, desto kleiner wird der Anteil des ihm zugänglichen Porenvolumens. Diffundieren Moleküle

in Poren hinein, so werden sie solange nicht weitertransportiert, wie sie sich in den Poren aufhalten. Kleine Moleküle diffundieren stärker in die Zwischenräume des Netzes und bleiben länger auf der Säule, größere Moleküle passieren die Säule schneller. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist demnach umso höher, je größer die Moleküle sind. Im Anschluss an die Trennung nahm ein Fraktionssammler das Eluat auf. Durch ein abschließendes Spülen mit 2 l MeOH (+1% HCl) sollten auch die letzten Substanzreste noch von der Säule gelöst werden. Welche Fraktionen vereinigt werden konnten, wurde mittels analytischer HPLC bestimmt.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie mit unterschiedlichen Laufmittelgemischen wurde auf Kieselgel-Alufolien 60 F₂₅₄, RP-18 DC-Platten F_{254S} und HPTLC-Fertigplatten CN F_{254S} (Fa. Merck) durchgeführt, und diente zur Optimierung der unterschiedlichen Elutionsgemische für die Säulenchromatographie (VLC und LPLC). Zunächst wurde eine kleine Menge Testsubstanz in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und 1 cm vom unteren Plattenrand entfernt mit einer Glaskapillare aufgetragen. Die DC-Platten wurden in einer mit 20 ml Lösungsmittel gefüllten DC-Kammer (20 x 20 cm) bis zu einer Laufhöhe von 8 cm entwickelt. Nach Verdunsten des Fließmittels erfolgte die Markierung der unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm beobachteten Banden mit einem Bleistift. Zur Intensivierung und Differenzierung der auftretenden Fluoreszenzen wurden die DC-Platten anschließend in Kaliumpermanganatlösung getaucht und mit einem Heißluftföhn erwärmt. Beim Trocknen wird das Kaliumpermanganat von den zurückgebliebenen Substanzen zu Braunstein reduziert und die Substanzflecken färben sich braun. Die gefärbten Flecken wurden ebenfalls markiert. Bei DC-Platten aus Kieselgel dienten Gemische aus Hexan/Ethylacetat als Fließmittel, während auf Diol-Platten Gemische aus Dichlormethan/Methanol und auf RP-DC-Platten Gemische aus Acetonitril/Methanol/Wasser oder Chloroform/Methanol zum Einsatz kamen.

Vakuum-Flüssig-Chromatographie (VLC)

Zunächst wurde die Testsubstanz in einem leichtflüchtigen Lösungsmittel (z.B. Dichlormethan) gelöst und in einem Glaskolben mit Kieselgelpulver vermischt. Anschließend dampfte man das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer ab und erhielt ein mit Probesubstanz gesättigtes Kieselgel. Dieses wurde als dünne, gleichmäßige Schicht auf eine ca. 5 cm hoch mit Kieselgel gepackte Fritte aufgebracht und mit Filterpapier bedeckt. Anschließend erfolgte eine Gradientenelution mit je 250 ml Hexan/Ethylacetat-Gemischen (von unpolar nach polar), wobei nach jedem Lösungsmittelgemisch die „Säule“ trocken gesaugt wurde. Die letzte Elution erfolgte

mit Methanol, um alle Substanzen von der Säule zu spülen. Die Fraktionen wurden eingengt und per HPLC und NMR analysiert.

Niederdruck-Flüssigchromatographie (LPLC)

Zur Durchführung der LPLC wurde eine vorgepackte Kieselgel-Lobar-Fertigsäule (LiChroprep® DIOL, Korngröße 40-63 µm, Fa. Merck) verwendet. Die Elution erfolgte isokratisch mit Luft bei einem Druck von 2–4 bar mit einem DC-chromatographisch optimierten Lösungsmittelgemisch.

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC ist eine Säulenchromatographie, bei der hoher Druck angewandt wird und somit kleine Korngrößen verwendet werden können, was zu einer verbesserten Trennleistung führt. Durch die hohen Durchflussraten werden kurze Analysenzeiten ermöglicht. Der Trennmechanismus beruht darauf, dass die mobile Phase mit dem Analyten mehr oder weniger stark um die Adsorptionsplätze konkurriert. Je besser es dem Eluenten gelingt, den Analyten von der stationären Phase zu verdrängen, desto kürzer sind die Retentionszeiten. Die Verbindungen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität getrennt. Adsorptionsvorgänge sind vor allem bei der Normalphasen-(NP)-Chromatographie von Bedeutung. Bei der Umkehrphasen-(RP)-Chromatographie kommt eher die Gleichgewichtseinstellung eines Stoffes zwischen zwei flüssigen, nicht mischbaren Phasen zum Tragen. Eine Trennung erfolgt hier dadurch, dass der Eluent versucht, den Analyten in die stationäre Phase zu verdrängen. Dies gelingt umso besser, je hydrophober bzw. unpolarer der Analyt ist. Dementsprechend länger werden auch die Retentionszeiten.

Die Analysen wurden mit einem System der Firma JASCO durchgeführt:

- Pumpe: JASCO PU-1580 Intelligent HPLC Pump
- Degaser: JASCO DG-1580-54-4 Line Degaser
- Detektor: JASCO MD-1510 Multiwavelength Detector
- Probengeber: JASCO AS-1555 Intelligent Sampler
- Gradientenmischer: JASCO LG-1580-04 Quarternary Gradient Unit
- Steuerung: BORWIN Version 1.5
- Fraktionssammler: Advantec SF-2120 Super Fraction Collector
- Detektor: SEDERE ERC Sedex 75 (Detektion bei 263 nm)

Das eingesetzte Säulenmaterial sowie die üblicherweise verwendeten Gradienten sind nachfolgend aufgeführt.

Analytische Säule: Korngröße=5 μm , Säulenlänge=250 mm, Säulendurchmesser=4,6 mm
gefüllt mit Kromasil RP-18 (Knauer).

\Rightarrow Gradientenelution: 0-80% ACN/H₂O unter Zusatz von 0,1% TFA für 40 min, 100% ACN + 0,1% TFA 45 min, 50% MeOH/ACN + 0,1% TFA für 50 min, 100% MeOH bis 65 min

Analytische Säule: Korngröße=7 μm , Säulenlänge=250 mm, Säulendurchmesser=4,6 mm,
gefüllt mit **Diol** Kromasil RP-18 (Knauer).

\Rightarrow Gradientenelution: 100% ACN für 25 min, 50% H₂O/ACN 30 min, 50% MeOH/H₂O 40 min, 100% MeOH 45 min

Präparative Säule: Korngröße=7 μm , Säulenlänge=250 mm, Säulendurchmesser=16 mm,
gefüllt mit **Diol** Kromasil RP-18 (Knauer).

\Rightarrow Gradientenelution: 95% ACN/H₂O 5 min, 60% ACN/H₂O 40 min

5.1.2.2 Spektroskopische Methoden

NMR (Nuclear magnetic resonance)–Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte bei 30°C mit Bruker Avance 400 unter Verwendung der Standard Bruker Software. Alle Messungen wurden in DMSO-d₆ durchgeführt. Die angegebenen chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das kalibrierte Lösungsmittelsignal (¹H 2,50 ppm und ¹³C 39,5 ppm).

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem ESI-TOF (LCT, Micromass), Q-TOF (Micromass), microTOF (Bruker Daltonics) von Mitarbeitern der BASF-AG in Ludwigshafen aufgenommen. Die LCMS Analysen wurden mit einer Chromatographie-Anlage der Agilent 1100 Serie (Diodenarray-detektor) gekoppelt mit einem microTOF-Massenspektrometer (Bruker Daltonics) am Alfred-Wegener-Institut (AWI) in Bremerhaven durchgeführt.

5.1.3 Quantifizierung von L-6-Bromohypaphorin

Der Gehalt des aus *Pachymatisma johnstonia* isolierten L-6-Bromohypaphorins konnte mittels quantitativer HPLC-Analyse in verschiedenen Rohextraktproben dieses Schwammes bestimmt werden. Dazu wurden die Extrakte in einer Konzentration von 100 µl in das unter 5.1.2.1 beschriebene HPLC-System mittels Probengeber eingespritzt und unter folgenden Trennbedingungen analysiert:

Analytische Säule: Korngröße=7 µm, Säulenlänge=250 mm, Säulendurchmesser=4,6 mm, gefüllt mit **Diol** Kromasil RP-18 (Knauer).

⇒ Gradientenelution: 100% ACN für 25 min, 50% H₂O/ACN 30 min, 50% MeOH/H₂O 40 min, 100% MeOH 45 min, Flußrate: 1 ml/min

5.1.4 Metabolitenfreisetzung

Um festzustellen, ob Schwämme Substanzen nach außen abgeben, wurden sowohl mit *Fouling*-Organismen bewachsene als auch unbewachsene *Pachymatisma johnstonia* und *Esperosia fucorum* sowie Individuen von *Phakellia ventilabrum*, *Leucosolenia complicata* und *Cliona celata* direkt nach dem Sammeln (Mai 2003, Red Nev) in geschlossene, belüftete 36x22x26 cm große Plastikboxen mit filtriertem Seewasser (2 µm) gesetzt. Die Boxen wurden in auf dem Achterdeck des Forschungsschiffes Heincke montierte Tanks mit Meerwasserdurchfluss gestellt, um möglichst natürliche Wassertemperaturen und Lichtbedingungen zu schaffen. Nach 24 h Hälterung wurde das Wasser zur Anreicherung der organischen Bestandteile aus den Schwammboxen über eine RP-Silikagel-Säule (Varian Mega Bond Elut C18) gepumpt (modifiziert nach Schulte et al. 1991). Ein Versuchsansatz ohne Schwamm diente als Kontrolle. Die Säulen und die Schwämme wurden anschließend bis zur Extraktion bei -20°C tiefgefroren. Im Labor erfolgte die Elution der RP-18 Säulen mit Methanol. Der erhaltene Extrakt wurde im Rotationsverdampfer eingedunstet, HPLC-chromatographisch analysiert und mit den Chromatogrammen der Schwammextrakte verglichen.

5.2 Schwammpartitionierung

5.2.1 Herstellen von Nadelpräparaten

Zur taxonomischen Bestimmung der Schwämme wurde jeweils ein ca. 5 mm³ großes Schwammstück mit einer Pinzette entnommen und in ein Probenglas mit 5 ml verdünnter Natriumhypochlorit-Lösung überführt. Nach ca. 20 min wurde das aufgelöste Schwammgewebe zusammen mit der Bleichlösung abpipettiert, die zurückgebliebenen Nadeln mehrmals mit destilliertem Wasser gespült und anschließend in Ethanol konserviert. Die hergestellten Präparate dienen zur Bestimmung und Dokumentation der Schwammproben (Nadelfotos vgl. Anhang S. 141-196) Dauerpräparate aller Nadeln sind bei der Meeresstation Helgoland hinterlegt.

5.2.2 Trennung der Schwammschichten

Um die Schwammschichten (Pinacoderm und Mesohyl) getrennt zu extrahieren, wurde die Außenschicht (Pinacoderm) der Schwämme mit einem Skalpell abgeschält, das Volumen beider Schichten bestimmt und die Proben bei –20°C bis zur Extraktion tiefgefroren.

5.2.3 Trennung von Schwamm- und Bakterienzellen

Eine Separation von Schwamm- und Bakterienzellen sollte die Lokalisierung der Hauptmetaboliten ermöglichen. Vor der Trennung wurden die in Tabelle 5.1 aufgelisteten Schwammarten mit sterilem Meerwasser gespült sowie Volumen und Frischgewicht bestimmt.

Tabelle 5.1: Übersicht zur Schwamm- und Bakterienzelltrennung.

Organismus			Probe	
Art	Fraktion	Bewuchs	Volumen (ml)	Frischgewicht (g)
<i>Leucosolenia complicata</i>	komplett	mit Rotalgen	60	55,74
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	außen	unbewachsen	55	47,9
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	innen	unbewachsen	380	400,5
<i>Cliona celata</i>	außen	unbewachsen	45	44,46
<i>Cliona celata</i>	innen	unbewachsen	240	245,6

Das Schwammgewebe wurde mit Ausnahme von *Leucosolenia complicata* in Pinacoderm und Mesohyl getrennt und im Potter unter Zusatz von 0,2 µm-filtriertem, autoklaviertem Seewasser zerkleinert. Die Schwammmasse wurde in sterile Falcon-Röhrchen überführt und bei 20°C und 3500 g für 30 min zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden unter dem Mikroskop untersucht um sicher zu gehen, dass keine Schwammnadeln oder -zellen darin zurückgeblieben waren. Der restliche Überstand wurde dekantiert, vom Pelett (Schwammzellen) getrennt und bis zur Extraktion in Dichlormethan/Methanol (1:1) eingefroren.

5.2.4 Bakterienzählung

Ein Schwammstück von 1 cm³ wurde zerteilt, in einen Potter überführt, in 10 ml sterilem Seewasser (2 µm-filtriert, autoklaviert) zerkleinert und anschließend 30 min in 4% Formol im Kühlschrank fixiert (Tab. 5.2). Die fixierte Probe wurde 1 min bei 3500 g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und 1 ml davon mit DAPI (Endkonzentration 1 µg/ml) 15 min bei Zimmertemperatur angefärbt. Die gefärbten Bakterienzellen wurden in den Konzentrationen 100 µl und 500 µl auf einen Polycarbonatfilter (2 µm) gezogen (n=5 pro Schwammfraktion und Konzentration).

Tabelle 5.2: Auf Bakteriendichte untersuchte Schwammarten.

Schwammart	Fraktion
<i>Esperiopsis fucorum</i>	komplett
<i>Phakellia ventilabrum</i>	komplett
<i>Leucosolenia complicata</i>	komplett
<i>Cliona celata</i>	außen
<i>Cliona celata</i>	innen
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	außen
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	innen

DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) lagert sich zwischen AT-reiche Regionen der DNA-Moleküle ein und färbt alle DNA-haltigen Strukturen. Wird der Farbstoff mit Licht der Wellenlänge 345 nm angeregt, fluoreszieren die Bakterienzellen bei etwa 450 nm in kräftigem Hellblau. Zur Zählung wurden die Proben auf einen Objektträger aufgebracht und pro Filter fünf

Flächen mit dem Axioskop 2plus (Zeiss) unter Fluoreszenz bei 400facher Vergrößerung unter Verwendung eines Netzmikrometers ausgezählt. Anschließend wurde die Bakterienzahl auf die Filterfläche bzw. auf die Bakterienmenge pro Schwammstück hochgerechnet. Dazu wurden die Flächen des Netzmikrometers und des Filters auf die entsprechende Vergrößerung bezogen umgerechnet. Der Mittelwert der pro Feld gezählten Bakterienzahlen wurde zunächst auf die Filterfläche hochgerechnet:

$$\text{Anzahl Bakterien/Feld} \times 100 = \text{Bakterien/Rasterfläche}$$

Danach wurde die Anzahl der Bakterien bezogen auf die Filterfläche berechnet (Tab. 5.3):

$$\text{Bakterien/Rasterfläche} \times 3,39 = \text{Bakterien/Filterfläche}$$

Nun wurde die Bakterienzahl/Filterfläche mit 1000 multipliziert, um die in 1 cm³ Schwamm enthaltene Bakteriendichte zu errechnen. Diese wurde dann sowohl zwischen den einzelnen Schwammarten als auch zwischen Außen- und Innenschicht der einzelnen Schwämme verglichen.

Tabelle 5.3: Berechnung der Bakteriendichte/cm³ Schwamm.

Netzmikrometer original 156,25 mm²
⇒ Rasterfläche bei 400x 94556,25 µm²

Filterfläche original 529,00 mm²
⇒ Filterfläche bei 400x 320 600,00 µm²

Filterfläche/Rasterfläche=Faktor ⇒ **3,39**

Mittelwert ausgezählte Bakterien • 100 • 3,39 = Bakterienzahl/Filter.

5.3 Schwammhälterung

Vor den Orkneys gesammelte Individuen von *Pachymatisma johnstonia* und *Cliona celata* wurden in großen, auf dem Schiffsdeck montierten Seewassertanks nach Helgoland transportiert. Die Schwammstücke wurden mit Kabelbindern auf PVC-Platten befestigt, und auf Helgoland in Glasaquarien mit Durchfluss gehängt (Abb. 5.1). Das Seewasser für diese Becken wird vor dem Helgoländer Nordosthafen angesaugt und nur grob vorfiltriert in das erste von insgesamt drei Vorratsbecken gepumpt, bevor es in die Schwammbecken fließt. Dadurch setzt sich ein Großteil des eingetragenen Sediments ab, und die Wassertemperatur gleicht sich an die Bedingungen im Hälterungsraum an. Vom letzten Vorrattank wird das Wasser in die Schwammbecken geleitet und fließt anschließend wieder zurück, um sich mit dem Frischwasser zu mischen. Dieses Zirkulationssystem sorgt für stabile Wasserbedingungen und ermöglicht eine hohen Durchflussrate. Außerdem erzeugen in den Schwammaquarien installierte Umwälzpumpen eine zusätzliche Wasserströmung.

Die Tiere werden nicht gefüttert – sie ernähren sich von den Partikeln, die das ungefilterte Wasser mit sich bringt. Die Temperatur im Hälterungsraum ist auf 13°C eingeregelt. Die Wassertemperatur schwankt abhängig von der Jahreszeit geringfügig und liegt im Durchschnitt bei 10°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Der Raum wird nicht künstlich beleuchtet. Durch ein 1x1 m großes Fenster fällt von außen schwaches Tageslicht in den Kellerraum.



Abbildung 5.1: Schwammhälterung im gekühlten Nasslabor der Meeresstation Helgoland. (a) Schwammaquarien, (b) Vorrattanks.

5.4 Biotests

Die Durchführung der Biotests fand auf Helgoland statt, da hier mit den Orkney- und Shetland-Inseln vergleichbare ökologische Bedingungen herrschen. Abgesehen von den abiotischen Faktoren wie Wassertemperatur, Salzgehalt, Strömungs- und Lichtverhältnisse entsprechen auch die auf dem Helgoländer Felssockel heimischen Artengemeinschaften denjenigen der Probenahmestellen (de Kluijver 1991, 1993; eigene Beobachtungen).

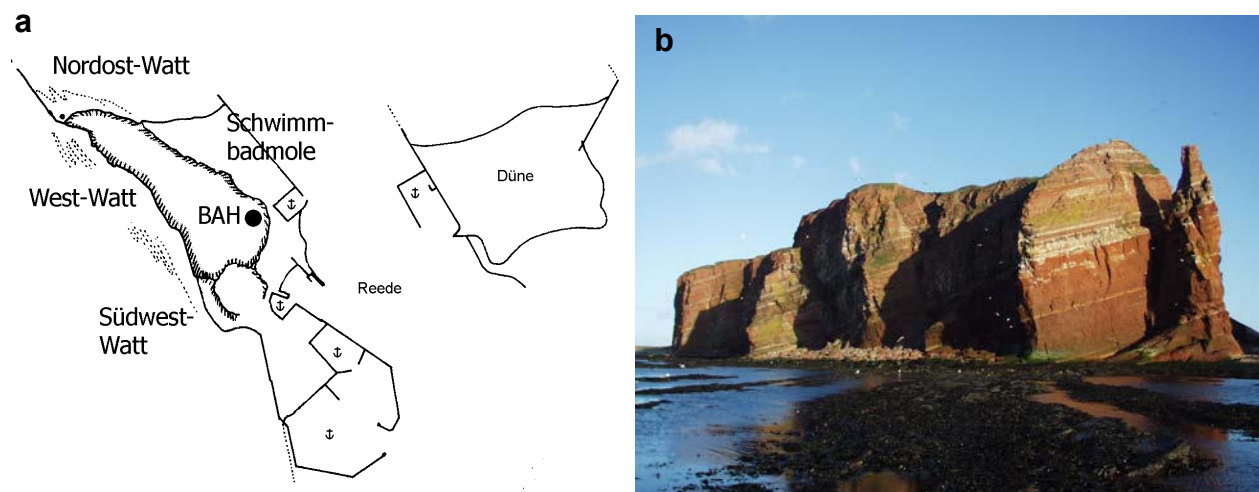


Abbildung 5.2: Probennahme- und Versuchsorte auf Helgoland. (a) Übersicht (Quelle: public-server Helgoland), (b) Nordost-Felswatt.

5.4.1 Antilarval-Biotests

Die Vorbereitung der Extrakte sowie die Auswertung der Tests war bei allen Versuchsansätzen gleich und wird nachfolgend einmal beschrieben. Die Larven stammen mit Ausnahme der *Artemia salina*-Larven alle von Tieren, die im April 2002 im Gebiet um Helgoland gesammelt wurden (Abb. 5.2). Alle Larven wurden innerhalb eines Tages nach dem Schlüpfen getestet. Die Schwammrohextrakte wurden in ein Reaktionsgefäß eingewogen und mit 100 μ l Aceton und 300 μ l Meerwasser im Ultraschallbad (15 min) gelöst. Für jeden Versuch wurde eine Kontrolllösung (ohne Extrakt) angesetzt. Die Probenlösung wurde anschließend in Versuchsschalen mit jeweils 10 ml Meerwasser pipettiert. Um toxische Effekte zu vermeiden, ließ man das Aceton vor Versuchsbeginn komplett abdampfen. Vorversuche ergaben, dass dies bei Raumtemperatur ca. 20 min dauert. Bei den Versuchen kam, soweit nicht anders beschrieben, eine Schwammextraktkonzentration von 10 mg/ml zum Einsatz. Jedes Experiment wurde soweit möglich in drei Ansätzen durchgeführt (modifiziert nach Thompson et al. 1985).

Um die Wirkung der Extrakte in den unterschiedlichen Tests vergleichen zu können, wurde ein **Aktivitätsindex** (AI) nach 24 h bzw. teilweise auch nach 48 h Inkubation (**AI₂₄**, **AI₄₈**) definiert. Dieser ergab sich durch die Division des gemittelten prozentualen Anteils lebender Larven in der Extraktlösung durch den gemittelten prozentualen Anteil lebender Larven in der Kontrolle: $AI = 1 - (\% \text{ lebende Larven Extrakt} / \% \text{ lebende Larven Kontrolle})$. Der Aktivitätsindex kann Werte von 0 bis 1 annehmen (1=100% Larvensterblichkeit=maximale Toxizität).

5.4.1.1 Toxizität gegenüber Schwammlarven (*Halichondria panicea*)

Bei einem Tauchgang im Mai 2002 wurden drei Schwämme von ca. 10 cm Größe an der Schwimmbadmole im Helgoländer Sublitoral gesammelt (Abb. 5.2) und in Durchflussbecken bei 14°C gehältert. Um die Abgabe der Larven zu induzieren, wurden Schwammstücke in eine Glasschale mit Meerwasser gesetzt und für 30 min in den Kühlschrank gestellt. Durch Temperatur- und Lichtschock konnten die Schwämme zur Abgabe der Larven angeregt werden. Allein das Zerschneiden des Schwammgewebes, wie von Würtz (1999) beschrieben, führte nicht zur Abgabe der Larven. Wichtig ist es, beim Umgang mit den Larven Glasgefäße zu benutzen, da sich die Tiere in Plastikschaalen schnell anheften und dann schlecht ab zu pipettieren sind (Abb. 5.3).

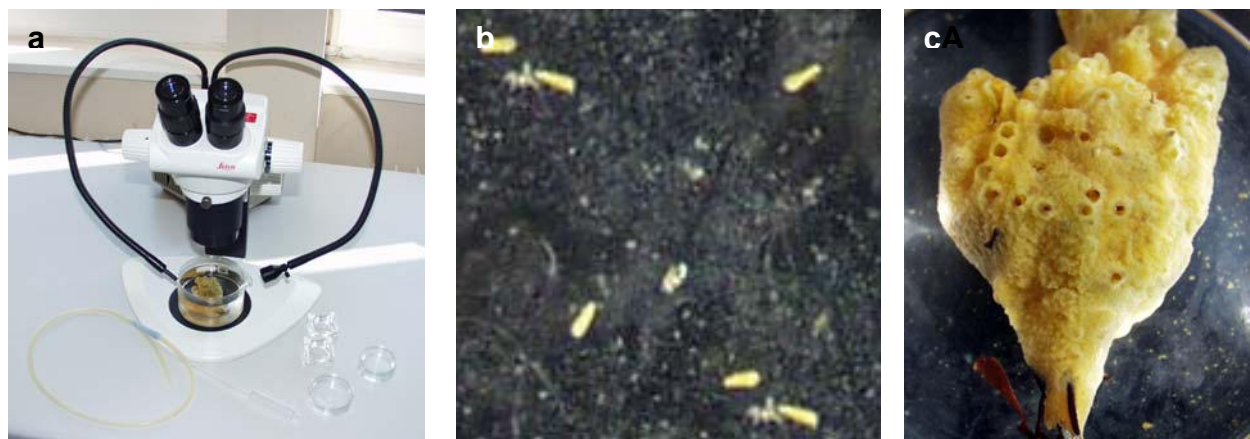


Abbildung 5.3: Durchführung der Larval-Biotests. (a) Versuchsaufbau, (b) Schwammlarven aus (c) *Halichondria panicea*.

Unter dem Binokular (Leica, 20x) wurden die Larven mit einer Schlauchpipette abgesaugt und jeweils 50 Larven in einem Schälchen konzentriert. In einer Plastikwanne wurden je Versuchsreihe drei bzw. vier Versuchsschalen mit einem Durchmesser von 6 cm aufgebaut. In jede Schale wurden 10 ml Meerwasser gefüllt, der Extrakt dazugegeben und je 50 Larven

zugefügt. Pro Versuchsreihe wurde eine Kontrollschale angesetzt. Nach Zugabe der Larven wurden die Proben bei 14°C und Dunkelheit im Hälterungsraum 24 h lang stehen gelassen. Danach erfolgte die Auszählung von lebenden und toten Larven unter dem Binokular. Da sich die Beschaffung der Larven als äußerst schwierig herausstellte, konnte keine Wiederholung des Versuchs stattfinden.

5.4.1.2 Toxizität gegenüber Ascidienlarven (*Polyclinum aurantium*)

Im Juli 2002 wurden larventragende Individuen von *Polyclinum aurantium* vor Helgoland von Tauchern in größeren Mengen gesammelt. Die Ascidien ließen sich nicht durch Temperatur- oder Hitzeschock zur Abgabe der Larven anregen, deshalb mussten diese mit Skalpell und Pinzette herauspräpariert werden. Die Durchführung und Auswertung des Versuchs erfolgte wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben. Das Fortschreiten der Metamorphose und die Vitalität der Larven wurden nach 24 h bzw. 48 h überprüft.

5.4.1.3 Toxizität gegenüber Crustaceen-Larven (*Carcinus maenas*)

Im Helgoländer Südwest-Watt (Abb. 5.2) im April 2003 gesammelte, eiertragende Strandkrabben-Weibchen wurden in Hälterungsbecken gesetzt (14°C und Dunkelheit) und täglich mit frischen Miesmuscheln gefüttert. Die geschlüpften Larven sind photophil und sammeln sich immer an der dem Licht zugewandten Seite eines Gefäßes, wodurch sie leicht abgesammelt werden konnten. Die Durchführung und Auswertung des Versuchs erfolgte wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben. Die Vitalität der Larven wurde nach 24 h bzw. 48 h überprüft.

5.4.1.4 Brine-shrimp-assay (Toxizität gegenüber *Artemia salina*-Larven)

Artemia-Eier wurden in einem 500 ml Becherglas mit filtriertem Meerwasser bei Raumtemperatur und guter Belüftung über Nacht zum Schlüpfen gebracht. 15 bis 25 Larven wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte mit 100 µl Testlösung (50 µl Meerwasser und 50 µl Extrakt) pro well pipettiert (Lee 1999). Dazu wurden Schwammextrakte in 100 µl Aceton gelöst und in 2 ml filtriertem Seewasser zu den folgenden Konzentrationen verdünnt: 50 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml und 2 mg/ml. Zusätzlich wurde der Test mit der *n*-Hexan-, Ethylacetat-, *n*-Butanol- und Wasserfraktion der aktiven Rohextrakte wiederholt (1 mg/ml). Der Versuch wurde wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

4.4.2 Phytagelversuch (*Antifouling*-Wirkung)

Um eine *Antifouling*-Wirkung der Extrakte nachzuweisen, wurde ein spezieller Versuchsaufbau entwickelt, der von April bis Juli 2003 an der Helgoländer Schwimmbadmole ausgebracht wurde (Abb. 2.3 und 3.13). Auf eine 20x38 cm große PVC-Platte wurden 12 Petrischalen so montiert, dass sie mit der Plattenoberfläche eine Ebene bildeten. Dies gewährleistete ein gleichmäßiges Vorbeiströmen des Meerwassers. In die Petrischalen wurde das seewasserstabile, mit dem jeweiligen Extrakt versetzte Phytagel so gegossen, dass durch ein Loch in der Petrischale bzw. eine entsprechende Aussparung in der Grundplatte ein „Anker“ entstand, der das Aufschwimmen des Gels verhindern sollte (Abb. 5.4).



Abbildung 5.4: Versuchsplatte – elf Schalen mit Phytagel gefüllt, eine noch frei (hier sind das Loch in der Petrischale und darunter durchscheinend die Aussparung (Pfeil) zu sehen).

Phytagel™ (Sigma-Aldrich) ist eine Agar-ähnliche Substanz, bestehend aus Glucuronsäure, Rhamnose und Glucose, die bei ca. 30°C fest wird und besonders stabil und seewasserbeständig ist (Henrikson & Pawlik 1995). Da nur eine begrenzte Anzahl von Platten ausgebracht werden konnte, wurden nicht alle Schwammextrakte getestet. Die zu testenden Extrakte wurden nach der verfügbaren Menge bzw. nach ihrer Aktivität in früheren Biotests ausgewählt. Die Reinstoffen Trigonellin, Homarin und Inosin sowie die Rohextrakte von *Esperiopsis fucorum*, *Sycon ciliatum*, *Leucosolenium complicata*, und die Butanolphasen von *Pachymatisma johnstonia* und *Myxilla fimbriata* sowie die Hexanphase von *Phakellia ventilabrum*, die Essigesterphase von *P. johnstonia* und die Wasserphase von *Isodictya palmata* wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml getestet. Die Konzentration wurde in Anlehnung an die Larval-Biotests (April 2002) gewählt. Um pro Extrakt drei Schalen zu gießen, wurden jeweils 90 mg

Extrakt in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße eingewogen und in 2 ml Methanol für 15 min im Ultraschallbad gelöst. In 150 ml Enghals-Erlenmeyerkolben wurden 2,93 g Phytigel eingewogen und mit 90 ml Wasser versetzt. Diese Mischung wurde unter ständigem Rühren auf einer Heizplatte mit Magnetrührer bis zum Kochen erhitzt. Nach Abkühlen des Phytagels auf ca. 50°C wurde der Extrakt zugegeben, gründlich untergerührt und gleichmäßig auf die drei Petrischalen verteilt (Methode abgewandelt nach Henrikson & Pawlik 1995). Auf jeder PVC-Platte wurde außerdem eine Kontrollschale (Phytigel nur mit Methanol, ohne Extrakt) gegossen. Nach dem Abkühlen wurden die fertigen Platten in Plastiktüten verpackt und bis zur Ausbringung ins Freiland im Kühlschrank gelagert.

Die Montage der Platten erfolgte am Morgen nach dem Gießen. Tauchend wurden je zwei Platten an einer Leiter der Schwimmbadmole mit Kabelbindern in einem Abstand von 2,5 m vom Grund und unterhalb der Niedrigwasserlinie angebracht. Nach 36-tägiger (28.04.-04.06.2003) Inkubation wurden die Platten abmontiert, fotografiert und der Aufwuchs sowie die Algenbiomasse ermittelt. Die Determination der Invertebraten erfolgte nach Hayward & Ryland (1995), die Algenarten wurden nach Brodie & Irvine (2003) bestimmt.

Zur Quantifizierung der bewachsenen Fläche wurde dreimal eine 1 cm² große Fläche ausgezählt. So entstanden vier Kategorien. Kategorie 1 kennzeichnete kaum bewachsene Platten bzw. Extrakte mit potentieller *Antifouling*-Wirkung. In Kategorie 2, 3 und 4 wurden mäßig bis extrem mit fädigen Grünalgen bewachsene Gele eingeteilt. Danach wurde der Bewuchs mit einem Skalpell vorsichtig abgekratzt und zwei Tage im Trockenschrank bei 80°C getrocknet und ausgewogen.

Anschließend wurde eine zweite Testreihe ausgebracht. Neben den Extrakten wurde in diesem Ansatz zusätzlich je 90 ml frisches, im Mörser zerkleinertes, filtrierte Schwammgewebe in die Gele eingearbeitet. Um die Sukzession der Besiedlung sowie die Diffusion der Extrakte aus dem Gel zu bestimmen, wurden die Platten nach fünf-, elf-, 15- und 20-tägiger Exposition kontrolliert, einzelne Kontrollgele entnommen und bis zu ihrer Extraktion tiefgefroren. Die kompletten Platten wurden nach vier Wochen aus dem Wasser genommen und wie oben beschrieben ausgewertet. Die gefrorenen Kontrollgele wurden gefriergetrocknet, zerkleinert und in Dichlormethan/Methanol (1:1) wie unter 5.1 beschrieben extrahiert und HPLC-analytisch untersucht.

5.4.3 Agardiffusionstest

Ein Agardiffusions- oder Hemmhoftest (Zähner 1965; Drews 1976) diene zur Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität der Schwammextrakte. Dafür wurden sowohl ökologisch als auch pharmakologisch interessante Bakterien verschiedener taxonomischer Gruppen ausgewählt. Ein Teil der in Tab. 5.4 aufgeführten Bakterienstämme wurde aus dem Brotkrumenschwamm *Halichondria panicea* isoliert (Perovic et al. 1998). Alle anderen Arten stammen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig). Die einzelnen Bakterienstämme werden wie folgt charakterisiert (Madigan et al. 2000):

Gram-positive Bakterien: Sehr diverse Gruppe. Gemeinsames Merkmal ist der Aufbau der Zellwand. Diese besteht zu 90% aus Peptidoglykan. Gram-positive Bakterien werden aufgrund des Guanin- und Cytosin-Gehaltes der DNA in **High GC Actinobacteria** und **Low GC Actinobacteria** unterteilt.

Gram-negative Bakterien = α -, β -, γ -, δ - Proteobacteria: Diese Gruppe wurde anhand von Ähnlichkeiten in der 16S rRNA-Sequenz zusammengestellt. Die Organismen sind durch eine extreme morphologische und ökologische Diversität charakterisiert. Auch ihr Metabolismus kann sehr unterschiedlich sein.

Archaea: Archaeobakterien bewohnen oft extreme Habitate. Kennzeichnend ist ihre besondere Zellwandstruktur, die weder das bakterientypische Peptidoglykan noch ethergebundene Membranlipide enthält.

Bacteroidetes (Cytophaga/Flavobacteria): Diese Bakterien reagieren gram-negativ und werden aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten und eines charakteristischen Gehaltes an Guanin und Cytosin (% mol) zusammengefasst.

Planctomycetales: Die Bakterien dieser vollkommen eigenständigen Gruppe leben im Süß- und Salzwasser. Würde man eine Gram-Färbung durchführen, so wären sie als gram-negativ klassifizierbar. Tatsächlich unterscheiden sie sich von dieser Gruppe durch eine einzigartige Zellwandstruktur. Planctomycetales besitzen kein Peptidoglycan. Ein weiteres Charakteristikum ist die Fortpflanzung mittels Knospung.

Zur Anzucht benötigten die ausgewählten Bakterien teilweise unterschiedliche Nährmedien (Tab. 5.4, Medienzusammensetzung siehe Anhang S. 201 und 202). Zur Herstellung der Medien wurden zuerst alle Zutaten (bis auf hitzeempfindliche Stoffe wie Glucose, die steril filtriert wurden) in Schottflaschen eingewogen. Dann wurde der Agar im Autoklaven angelöst, der pH-Wert eingestellt, die Medien autoklaviert und entweder Platten gegossen (20 ml Medium/Platte) oder Flüssig- bzw. Weichagarmedien aliquotiert (40 ml/Kultur). Die fertigen Platten und Aliquote wurden mit einem Strichcode markiert und bei 4°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Tabelle 5.4: Bakterienstämme (ÜN: über Nacht, 2N: 2 Nächte, T_{IK}: Inkubationstemperatur)

Bakterienart	Wachstum	T _{IK} (°C)	Bakterienstamm	Medium
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ÜN	30	γ	DSMZ Nr. 1
Alpha proteobacterium [AJ244780.1]; 98%	2N	18	α	2216E
<i>Alteromonas macleodii</i> [Y18234.1]; 96%	2N	18	γ	2216E
<i>Aquaspirillum psychrophilum</i>	langsam	20	β	DSMZ Nr. 790
<i>Bacillus badius</i>	ÜN	30	LowGC	DSMZ Nr. 1
<i>Bacillus subtilis</i>	ÜN	30	LowGC	DSMZ Nr. 1
<i>Comamonas testosteroni</i>	ÜN	30	β	DSMZ Nr. 1
<i>Cytophaga</i> sp. [AB017046.1]; 92%	ÜN	18	Bacteroidetes	2216E
<i>Escherichia coli</i>	ÜN	25	γ	DSMZ Nr. 1
<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	-	25	Bacteroidetes	DSMZ Nr. 67
Gram ⁺ str. 121 [AB008511.1]; 95%	ÜN	18	HighGC	2216E
<i>Halobacterium salinarium</i>	langsam	25	Archaea	DSMZ Nr. 97
<i>Microbacterium barkeri</i>	ÜN	30	HighGC	DSMZ Nr. 53
<i>Micrococcus</i> sp. [X86608.1]; 97%	ÜN	18	HighGC	2216E
<i>Myxococcus coralloides</i>		30	δ	DSMZ Nr. 222
<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	ÜN	22	γ	2216E
<i>Planctomyces brasiliensis</i>	ÜN	30	Planctomycetales	DSMZ Nr. 607
<i>Planococcus citreus</i>	2N	26	HighGC	DSMZ Nr. 1 M
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. [U85861.1]; 97%	ÜN	18	γ	2216E
<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i>	ÜN	25	γ	2216E
<i>Roseobacter litoralis</i> [X78312.1]; 96%	ÜN	18	α	2216E
<i>Ruegeria algicola</i>	2N	28	α	2216E
<i>Serratia rubidaea</i>	2N	26	γ	DSMZ Nr. 1 M
<i>Streptomyces purpureus</i>	ÜN	28	HighGC	DSMZ Nr. 65
<i>Vibrio fischeri</i>	ÜN	25	γ	2216E
<i>Vibrio harveyi</i>	ÜN	25	γ	2216E
<i>Vibrio</i> sp. Sk1 [AF242274.1]; 98%	-	18	γ	2216E
<i>Xanthomonas campestris</i>	ÜN	26	γ	DSMZ Nr. 54
<i>Zobellia uliginosa</i>	2N	26	Bacteroidetes	2216E

Die Bakterienstämme wurden zunächst in Erlenmeyerkolben bei den entsprechenden Temperaturen (18°C, 25°C, 27°C) auf Schüttlern oder Magnetrührern bis zum Erreichen der erforderlichen Wachstumsdichte, die anhand der Trübung des Kulturmediums beurteilt wurde, herangezogen. Verwendbare Ansätze wurden innerhalb von zwei Tagen zur Durchführung der Hemmhoftests genutzt. Dazu wurde der Weichagar aufgekocht, verflüssigt und je 3,5 ml in sterile Reagenzgläser pipettiert. Diese wurden im Wasserbad warmgehalten. Nach Zugabe von 1 ml Bakterienkultur wurde die Mischung in die auf einem Tariertisch bereitgestellte entsprechende Platte mit dem Festmedium gegossen. Das Bakterien-Nährstoffgemisch wurde gleichmäßig ohne Luftblasenbildung verteilt und zum Trocknen beiseite gestellt. Platten und Bakterienkulturen sollten bei der Verarbeitung Zimmertemperatur haben.

Die Extrakte wurden in drei verschiedenen Konzentrationen getestet (100, 200, 400 µg/Plättchen). Sofern in ausreichender Menge vorhanden, wurden zusätzlich Reinsubstanzen gegenüber solchen Bakterien getestet, die sich in vorhergehenden Versuchen als sensitiv erwiesen. Dazu wurde zuerst die entsprechende Substanzmenge in ein Reaktionsgefäß eingewogen und in einem geeigneten Lösungsmittel, entweder Aceton oder Dimethylsulfoxid (DMSO), gelöst, anschließend bis zur gewünschten Konzentration verdünnt und je 50 µl Extrakt auf ein Filterplättchen (Durchmesser 12,7 mm) aufgetragen. Die getrockneten Plättchen wurden mit einer Federstahlpinzette einem festgelegten Muster folgend auf den Agarplatten ausgebracht (Abb. 5.5). Fertige Testplatten wurden bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert und eine Woche lang täglich kontrolliert bzw. das Bakterienwachstum fotografisch dokumentiert. Der Radius der Inhibitionszonen wurde ausgemessen, und die antimikrobielle Aktivität in folgende Klassen eingeteilt: Hemmradius <1 mm=geringe Aktivität, 1-2,5 mm=mittlere Aktivität und >2,5 mm=starke Hemmwirkung.

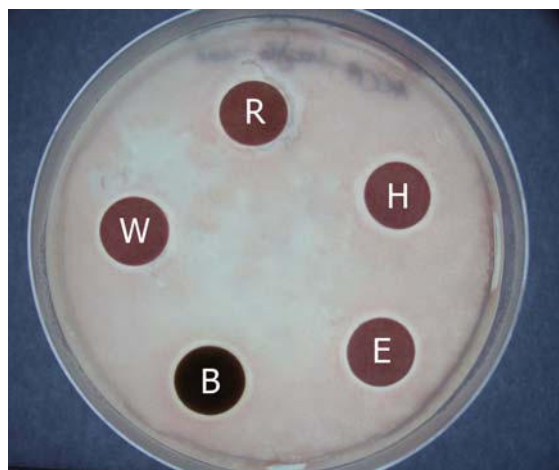


Abbildung 5.5: Anordnung der Filterplättchen auf den Agarplatten (R=Rohextrakt, H=Hexanphase, E=Essigesterphase, B=Butanolphase, W=Wasserphase).

5.4.4 Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) –Test

Die enzymhemmende Aktivität der Schwammextrakte wurde mit einem Protein-Tyrosin-Kinase-*Assay* Kit (SIGMA, PTK101) bestimmt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der beiliegenden Anleitung und wird kurz zusammenfassend dargestellt (Inkubationszeiten und –temperaturen werden nicht erwähnt). Der Rohextrakt, die Fraktionen und der PTK-Hemmstoff Piceatannol (Abb. 3.17), ein Pflanzenmetabolit, wurden in DMSO gelöst und mit Pufferlösung verdünnt in einer Konzentration von 200 µg/ml eingesetzt. Zusätzlich wurden die aktiven Phasen sowie Reinsubstanzen nochmals in Konzentrationen von 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml getestet, um die minimale Inhibitionskonzentration zu bestimmen. Als positive Kontrolle diente eine Lösung aus DMSO und dem Reaktionspuffer. Außerdem wurde eine nur aus Pufferlösung bestehende Probe zur Ermittlung des Blindwertes eingesetzt. Zur Durchführung des Tests wurden Mikrotiterplatten mit dem Enzymsubstrat poly-Glu-Tyr (PGT) beschichtet. Der verwendete PGT-Rest wird synthetisch hergestellt und kann von vielen verschiedenen Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) phosphoryliert werden. Dann wurden die Proben, der Hemmstoff und eine Blindprobe in die beschichteten *wells* pipettiert. Nach Zugabe von Enzym, Reaktionspuffer und ATP kam die Phosphorylationsreaktion der Tyrosinreste am Substrat in Gang. In diesem Test wurde das Enzym *epidermal growth factor receptor*=EGFR eingesetzt. Anschließend wurden die *wells* gewaschen und mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper versetzt, der an die phosphorylierten Reste bindet, und durch Zugabe einer bestimmten Substrat-Lösung (OPD) angefärbt wurde. Positive, also phosphorylierte und mit Antikörper markierte Proben erschienen orangegelb. Die relative PTK-Aktivität ließ sich dann als optische Dichte (OD) bei einer Absorption von 492 nm photometrisch bestimmen.

Die Aktivität (%) der Proben wurde berechnet als: $OD_{492nm} \text{ Probe} - OD_{492nm} \text{ Blindwert}$

Die OD_{492nm} der Positivprobe wurde definiert als 100% Enzymaktivität. Auf diesem Wert basierte die Berechnung der Hemmwirkung von Piceatannol und den Schwammextrakten:

$$\% \text{Restaktivität (EA}_R\text{) Extraktprobe} = OD_{492nm} \text{ Extraktprobe} * 100 / OD_{492nm} \text{ Positivprobe}$$

Entsprechend der für Piceatannol bestimmten Restaktivität, die bei den unterschiedlichen Versuchsansätzen zwischen zwei und elf Prozent schwankte, wurde die Hemmwirkung wie folgt klassifiziert: <40% Hemmeffekt, 41-140% keine Hemmung, >141% Enzymaktivierung

Hemmeffekte wurden als *stark (0-11%), **deutlich (12-22%), ***schwach (23-40%) bewertet.

5.4.5 Cytotoxizitätstests

Alle Schwammextrakte wurden zur Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF) nach Braunschweig geschickt. Dort wurde in der Abteilung Naturstoffbiologie die cytotoxische Wirkung der Schwammextrakte gegenüber der Murin-Tumor-Zelllinie L929 unter Verwendung eines MTT-Tests untersucht. Bei diesem Cytotoxstandardtest handelt es sich um einen kolorimetrischen nicht-radioaktiven Test, der auf der Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu lilafarbenen Formazan-Kristallen mittels zellulären Dehydrogenasen beruht. Die Absorption des entstandenen Formazans wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 550-600 nm bestimmt. In diesem Bereich absorbiert MTT nicht. Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als Maß für die Vitalität von Zellen (Mosmann et al. 1983). Ist der Extrakt cytotoxisch, arbeiten die Dehydrogenasen nicht. Es entstehen wenig/keine Formazan-kristalle und die Testfarbe bleibt gelb. Eine Standardzelllinie wurde mit Schwammextrakt gemischt und mit MTT versetzt. Die verwendeten Zellkulturen stammten von Fibroblasten aus dem Bindegewebe von Mäusen und kommen vor allem in *tumor-necrosis-factor detection-assays* zur Anwendung. Bei der GBF wurde die Aktivität leider nicht photometrisch bestimmt, daher liegen keine Messwerte vor und die Ergebnisse werden so wiedergegeben, wie sie von der GBF übermittelt wurden.

5.4.6 Statistische Methoden

Zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse (biologische Aktivität vorhanden, nicht vorhanden) wurde ein t-Test durchgeführt und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen (Lozan & Kausch 1998). Um Korrelationen zwischen der biologischen Aktivität der Schwammextrakte und taxonomischen und ökologischen Kriterien aufzudecken, wurden die Ergebnisse der Biotests unter der Verwendung des Statistikprogramms StatSoft (1997) einer Clusteranalyse im *Single-Linkage*-Verfahren unterzogen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ackermann D (1953) Über das Vorkommen von Homarin, Trigonellin und einer neuen Base Anemonin in der Anthozoe *Anemonia sulcata*. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 295: 1-9
- Ackermann D, Janka R (1953) Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 294: 93
- Ackermann D, List PH (1960) Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 318: 281
- Amade P, Pesando D, Chevolut L (1982) Antimicrobial activities of marine sponges from French Polynesia and Brittany. Mar Biol 70: 223-228
- Amade P, Charroin C, Baby C, Vacelet J (1987) Antimicrobial activities of marine sponges from the Mediterranean Sea. Mar Biol 94: 271-275
- Andersen RJ, Stonard RJ (1979) Clionamide, a major metabolite of the sponge *Cliona celata*. Can J Chem 57: 2325-2328
- Assmann M, Lichte E, Pawlik JR, Koeck M (2000) Chemical defenses of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. Mar Ecol Prog Ser 207: 255-262
- Ax P (1995) Das System der Metazoa. Fischer Verlag, Stuttgart, pp 66-76
- Bacescu M (1971) Les Spongiaires: un de plus intéressants biotopes benthiques marins. Rapport et proces-verbaux des réunions Commission internationale pour l'exploration scientifique de la mer Méditerranée Monaco 20: 239-241
- Baker BJ (1996) β -Carboline and isoquinoline alkaloids from marine organisms. In: Pelletier SE (Hrsg.) Alkaloids: Chemical and biological perspectives. Vol 10. Pergamon, Oxford
- Barthel D, Wolfrath B (1989) Tissue sloughing in the sponge *Halichondria panicea*: A fouling organism prevents being fouled. Oecologia 78: 357-360
- Beccero MA, Uriz MJ, Turon X (1995) Measuring toxicity in marine environments: Critical appraisal of three commonly used methods. Experientia 51: 414-418
- Becerro MA, Uriz MJ, Turon X (1997) Chemically-mediated interactions in benthic organisms: the chemical ecology of *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida). Hydrobiologia 355: 77-89

- Beccero MA, Lopez NI, Turon X, Uriz MJ (1994) Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J Exp Mar Biol Ecol* 179: 195-205
- Becker K, Wahl M (1991) Influence of substratum surface tension on biofouling of artificial substrata in Kiel Bay (western Baltic): In situ studies. *Biofouling* 4: 275-291
- Beers JR (1967) The species distribution of some naturally-occurring quaternary ammonium compounds. *Comp Biochem Physiol* 21:11-21
- Bergquist PR (1978) Sponges. University of Berkeley, California
- Bergquist PR, Bedford JJ (1978) The incidence of antibacterial activity in marine demospongiae, systematic and geographic considerations. *Mar Biol* 46: 215-221
- Bergquist PR, Wells RJ (1983) Chemotaxonomy of Porifera. In: Scheuer PJ (Hrsg.) *Marine natural products*. Vol 5. Academic Press, New York pp 1-46
- Bell JJ, Barnes D (2003) The importance of competitor identity, morphology and ranking methodology to outcomes in interference competition between sponges. *Mar Biol* 143: 415-426
- Berking S (1987) Homarine (N-methylpicolinic acid) and trigonelline (N-methylnicotinic acid) appear to be involved in pattern control in a marine hydroid. *Dev Comp Immunol* 99: 211-220
- Bloom S (1975) The motile escape response of a sessile prey: a sponge-scallop mutualism. *J Exp Mar Biol Ecol* 17: 311-321
- Blunt JWC, Munro MHG (1998) *MarinLit*. A database of the literature on marine natural products prepared and maintained by the Marine Chemistry Group (Department of Chemistry, University of Canterbury, New Zealand)
- Blunt JWC, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR (2003) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 20: 1-48
- Brodie JA, Irvine LM (2003) *Seaweeds of the British Isles*. Vol 1. Rhodophyta. British Phycological Society, London

- Brown JW, Kesler CT, Neary JT, Fishman LM (2001) Effects of marine sponge extracts on mitogen-activated protein kinase carcinoma cells. *Toxicol* 39: 1835-1839
- Burkholder PR, Rützler K (1969) Antimicrobial activity of some marine sponges. *Nature* 222: 983-984
- Cafieri F, Fattorusso E, Tagliatela-Scafati (1998) Novel betains from the marine sponge *Agelas dispar*. *J Nat Prod* 61: 117-1173
- Connor DW, Dalkin MJ, Hill TO, Holt RHF, Sanderson WG (1997) Marine biotope classification for Britain and Ireland. Vol 2. Sublittoral biotopes. Joint Nature Conservation Committee, Peterborough, JNCC Report no. 230, Version 97.06
- Costello MJ, Embrow C, White R (2001) European register of marine species. *Patrimoine naturels* 50: 463
- Czerpak R (1983) Allantoin as stimulator of some metabolic processes in *Anabaena*, *Chlorella* and *Scenedesmus* algae. *Pol Arch Hydrobiol* 30: 27-34
- Czerpak R, Bajguz A, Jozczyk A, Nosal A (2003) Effect of allantoin and creatine on the growth and content of some metabolites in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Int J Ecohydrology Hydrobiol* 3: 231-236
- Daglia M, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C, Gazzani G (2002) Antiadhesive effect of green and roasted Coffee on *Streptococcus mutans*. *J Agric Food Chem* 50: 1225-1229
- Daguzan J, Razet P (1971) Nitrogenous excretory products and their tidal variation in adult *Littorina littorea* (L.) (Mollusca, Mesogastropoda, Littorinidae). *Acad Sci Paris Ser D* 272: 2800-2803
- Dall W (1971) The role of homarine in decapod Crustacea. *Comp Biochem Physiol* 39: 31-44
- Davies AR, Butler AJ, van Altena I (1991) Settlement behaviour of ascidian larvae: Preliminary evidence for inhibition by sponge allelochemicals. *Mar Ecol Prog Ser* 72: 117-123
- De Caralt S, Agell G, Uriz M-J (2003) Long-term culture of sponge explants: conditions enhancing survival and growth, and assessment of bioactivity. *Biomol Eng* 20: 339-347

- De Kluijver M (1993) Sublittoral hard substratum communities off Orkney and St Abbs (Scotland). J Mar Biol Ass UK 73: 733-754
- De Vries DJ, Rao KS, Willis RH (1997) Application of a radioreceptor assay to the screening and characterisation of compounds from marine organisms with activity at the phorbol ester binding site of protein kinase C. Toxicon 35: 347-354
- Dobretsov S, Wahl M (2001) Recruitment preferences of blue mussel spat (*Mytilus edulis*) for different substrata and microhabitats in the White Sea. Hydrobiologia 445: 27-35
- Drews G (1976) Mikrobiologisches Praktikum. Springer Verlag, Berlin
- Duckworth A, Battershill C (2003) Sponge aquaculture for the production of biologically active metabolites: the influence of farming protocols and environment. Aquaculture 221: 311-329
- Duque C, Bonilla A, Bautista E, Zea S (2001) Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. Biochem Syst Ecol 29: 459-467
- Dyrinda P (1985) Chemical defences and the structure of subtidal epibenthic communities. Proceedings of the Nineteenth European Marine Biology Symposium Plymouth, Devon (United Kingdom) pp 411-424
- Edrada R, Stessman CC, Crews, P (2003) Uniquely Modified Imidazole Alkaloids from a Calcareous *Leucetta* Sponge. J Nat Prod 66: 939-942
- Encarnacion DR, Franzblau SG, Tapia CA, Cedillo-Rivera R (2000) Screening of marine organisms for antimicrobial and antiprotozoal activity. Pharm Biol 38: 379-384
- Faulkner DJ (2000) Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). Nat Prod Rep 17: 1-6
- Faulkner DJ (2001) Marine natural products. Nat Prod Rep 18: 1-49
- Faulkner DJ (2002) Marine natural products. Nat Prod Rep 19: 1-48

- Faulkner DJ, Bewley CA (1998) Steinschwämme: Stars unter den Naturstoffproduzenten oder Wirte der Stars? *Angew Chem* 110: 2280-2297
- Faulkner DJ, Ghiselin MT (1983) Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods, *Mar Ecol Prog Ser* 13: 295-301
- Fenical W (1997) New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends Biotechnol* 15: 339-341
- Friedrich AB, Fischer I, Proksch P, Hacker J, Hentschel U (2001) Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol Ecol* 38: 105-113
- Froehlich H, Barthel D (1997) Silica uptake of the marine sponge *Halichondria panicea* in Kiel Bight. *Mar Biol* 128: 115-123
- Furrow FB, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2003) Surface sequestration of chemical feeding deterrents in the Antarctic sponge *Latrunculia apicalis* as an optimal defense against sea star spongivory. *Mar Biol* 143: 443-449
- Fusetani N (2004) Biofouling and antifouling. *Nat Prod Rep* 21: 94-104
- Fusetani N, Hiroto H, Okino T, Tomono YYE (1996) Antifouling activity of isocyanoterpenoids and related compounds isolated from a marine sponge and nudibranchs. *J Nat Toxins* 5: 249-259
- Garson MJ (1993) The biosynthesis of marine natural products. *Chem Revs* 5: 1699-1733
- Garson MJ (1994) The biosynthesis of sponge secondary metabolites: why it is important. In: van Soest RWM, van Kempen TMG, Braekman J (Hrsg.) *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam pp 427-440
- Gatti S (2004) High antarctic carbon silicon cycling – how much do sponges contribute? *Boll Mus Ist Biol Univ Genova* 66-67: 76
- Green G (1977) Ecology of toxicity in marine sponges. *Mar Biol* 40: 207-215
- Grossberg RK (1991) Sperm-mediated gene flow and the genetic structure of a population of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Evolution* 45: 130-142

- Gupta KC, Miller RL, Williams JR (1977) Isolation of Homarine and Trigonelline from the hydroid *Tubularia larynx*. *Loydia* 40: 303-305
- Harvell CD, Fenical W, Greene CH (1988) Chemical and structural defenses of Caribbean gorgonians (*Pseudopterogorgia* sp.). 1. Development of an in situ feeding assay. *Mar Ecol Prog Ser* 49: 287-294
- Haslam E (1983) Secondary metabolism: fact and fiction. *Nat Prod Rep* 3: 217-249
- Hayward PJ, Ryland JS (1995) Handbook of the Marine Fauna of North-West Europe. University Press, Oxford
- Henrikson AA, Pawlik JR (1995) A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *J Exp Mar Biol Ecol* 194:157-165
- Hentschel U (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol* 68: 4431-4440
- Hentschel U, Schmid M, Wagner M, Fieseler L, Gernert C, Hacker J (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol Ecol* 35: 305-312
- Hentschel U, Fieseler L, Wehrl M, Gernert C, Steinert M, Hacker J, Horn M (2003) Microbial diversity in sponges. In: Müller WEG (Hrsg.) *Sponges (Porifera)*. Springer Verlag, Berlin pp 59-88
- Hiscock K (1998) Marine Nature Conservation Review. Benthic marine ecosystems of Great Britain and the north-east Atlantic. Peterborough, Joint Nature Conservation Committee. (Coasts and seas of the United Kingdom, MNCR Series)
- Hooper JNA, van Soest RWM (2002) *Systema Porifera: a guide to the classification of sponges*. Kluwer Academic, New York
- Hoppe-Seyler FA (1933) Zur Isolierung von Homarin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 22: 105
- Jackson J (1977) Competition on marine hard substrata: the adaptive significance of solitary and colonial strategies. *Am Nat* 111: 743-767

- Jennings JG, Steinberg PD (1997) Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia* 109: 461-473
- Jensen P, Harvell CD, Wirtz K, Fenical W (1996) Antimicrobial activity of extracts of Caribbean gorgonian corals. *Mar Biol* 125: 411-419
- Karlson P (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie: für Mediziner und Naturwissenschaftler. Thieme Verlag, Stuttgart
- Kelman DK, Kushmaro A, Loya Y, Kashman Y, Benayahu Y (1998) Antimicrobial activity of a Red Sea soft coral, *Parerythropodium fulvum fulvum*: Reproductive and developmental considerations. *Mar Ecol Prog Ser* 169: 87-95
- Kelman D, Kashman Y, Rosenberg E, Micha I, Ifrach I, Laya Y (2001) Antimicrobial activity of the reef sponge *Amphimedon viridis* from the Red Sea: evidence for selective toxicity. *Aquatic Microb Ecol* 24: 9-16
- Kirsch G (1999) Marine Makro- und Mikroorganismen als Quellen für HIV-1-RT- und p56lck-PTK-Inhibitoren. Dissertation der Technischen Universität Carola-Wilhelmina zu Braunschweig
- Klitgaard A (1995) The fauna associated with outer shelf and upper slope sponges (Porifera, Demospongiae) at the Faroe Islands, northeastern Atlantic. *Sarsia* 80: 1-22
- Kobayashi J, Ishibashi M (1993) Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem Rev* 93: 1753-1769
- Kobayashi M, Kitagawa I (1998) Likely microbial participation in the production of bioactive marine sponge chemical constituents. In: Watanabe Y, Fusetani N (Hrsg.) *Sponge sciences: multidisciplinary perspectives*. Springer Verlag, Tokyo pp 379-390
- Lee TH (1999) Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. *Acta Zoologica Taiwanica* 10:1-7
- Lee OO, Qian PY (2003) Chemical control of bacterial epibiosis and larval settlement of *Hydroides elegans* in the Red Sponge *Mycale adherens*. *Biofouling* 19: 171-180
- Lippert H (2003) Chemical ecology and palatability of marine invertebrates in the sub-Antarctic Kongsfjord (Spitsbergen). *Ber Polarforsch Meeresforsch* 465

- Lozan JL, Kausch H (1998) Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin
- Luckner M (1969) Der Sekundärstoffwechsel in Pflanze und Tier. Fischer Verlag, Jena
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000) Biology of Microorganisms. Prentice Hall, New York
- Martin D, Uriz MJ (1993) Chemical bioactivity of Mediterranean benthic organisms against embryo and larvae of marine invertebrates. J Exp Mar Biol Ecol 173: 11-27
- Mayer AMS, Gustafson KR (2003) Mini Review: Marine pharmacology in 2000: Antitumor and cytotoxic compounds. Int J Cancer 105: 291-299
- McCaffrey EJ, Endean R (1985) Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. Mar Biol 89: 1-8
- McClintock JB (1987) Investigation of the relationship between invertebrate predation and biochemical composition, energy content, spicule armament and toxicity of benthic sponges at McMurdo Sound, Antarctica. Mar Biol 94: 479-487
- McClintock JB, Gauthier JJ (1992) Antimicrobial activities of Antarctic sponges. Antarct Sci 4: 179-183
- McClintock JB, Hamann MT, Yoshida W, Slattery M, Heine JN, Bryan PJ, Jayatilake GS, Moon BH (1994) Homarine as a feeding deterrent in common shallow-water Antarctic lamellarian gastropod *Marseniopsis mollis*: A rare example of chemical defense in a marine prosobranch. J Chem Ecol 20: 2539-2549
- Miki W, Kon-ya K, Mizobuchi S (1996) Biofouling and marine biotechnology: new antifoulants from marine invertebrates. J Mar Biotechnol 4: 117-120
- Moon B, Baker BJ, McClintock JB (1998) Purine and nucleoside metabolites from the Antarctic Sponge *Isodictya erinacea*. J Nat Prod 61: 116-118
- Mourabit AA, Pusset M, Chtourou MG, Ahond C, Poupat A, Potier CP (1997) Pyraxinine, a Novel Nitrogenous Compound from the Marine Sponge *Cymbastela cantharella*. J Nat Prod 60: 290-291

- Munro MHG (1994) From seabed to sickbed. In: van Soest RWM, van Kempen TMG, Braekman JC (Hrsg.) Sponges in time and space. Balkema, Rotterdam pp 473-485
- Munro MHG, Blunt JW, Dumdei EJ, Hickford SJH, Lill RE, Li S, Battershill CN, Duckworth AR (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology* 70: 15-25
- Müller WEG (1993) Marine sponges: an overview. In: Sarma AS, Daum T, Müller WEG (Hrsg.) Secondary metabolites from marine sponges. Ullstein Mosby Verlag, Berlin pp 1-5
- Netherton JC, Gurin S (1982) Biosynthesis and physiological role of homarine in marine shrimp. *J Biol Chem* 257: 11971-11975
- Neves G, Omena E (2003) Influence of sponge morphology on the composition of the polychaete associated fauna from Rocas Atoll, northeast Brazil. *Coral Reefs* 22: 123-129
- Newbold RW, Jensen PR, Fenical W, Pawlik JR (1999) Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquat Microb Ecol* 19: 279-284
- Nishitania H, Kikuchi S, Okumura K, Taguchi H (1995) Finding of homarine-synthesizing enzyme in turban shell and some properties of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 322: 327-332
- Noble MEM, Endicott JA, Johnson LN (2004) Protein Kinase Inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 303: 1800-1805
- Nuhn P (1997) *Naturstoffchemie*. Hirzel Verlag, Stuttgart
- Oclarit JM, Yamaoka Y, Kamimura K, Ohta S (1998) Andrimid, an antimicrobial substance in the marine Sponge *Hyatella*, produced by the associated *Vibrio* bacterium. In: Watanabe Y, Fusetani N (Hrsg.) *Sponge sciences: multidisciplinary perspectives*. Springer Verlag, Tokyo pp 391-398
- Osinga R, Tramper J, Wijffels RH (1999) Cultivation of Marine Sponges. *Mar Biotechnol* 1: 509-53
- Osinga R, Armstrong E, Burgess JG, Hoffmann F, Reitner J, Schumann-Kindel G (2001) Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia* 461: 55-62

- Pawlik J (1983) A sponge-eating worm from Bermuda: *Branchiosyllis oculata* (Polychaeta, Syllidae). Mar Ecol 4: 65-79
- Pawlik JR (1992) Induction of marine invertebrate larval settlement: evidence for chemical cues. In: Paul VJ (Hrsg.) Ecological roles of marine natural products. Cornell University Press, pp 189-236
- Pawlik JR (1993) Marine invertebrate chemical defenses. Chem Revs 93: 1911-1922
- Pawlik JR, Chanas B, Toonen RJ, Fenical W (1995) Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. Mar Ecol Prog Ser 127: 183-194
- Pearse AS (1932) Inhabitants of certain sponges at Dry Tortugas. Carnegie Institution of Washington Publication 435: 117-124
- Pettit GR, Butler MS, Williams MD, Filiatrault MJ, Pettit RK (1996) Isolation and structure of hemibastadinols 1-3 from the Papua New Guinea marine sponge *Ianthella basta*. J Nat Prod 59: 927-934
- Pereira R, Carvalho AGV, Gama BAP, Coutinho R (2002) Field experimental evaluation of secondary metabolites from marine invertebrates as antifoulants. Braz J Biol 62: 311-320
- Perovic S, Wichels A, Schutt C, Gerdt G, Pahler S, Steffen R, Müller WEG (1998) Neuroactive compounds produced by bacteria from the marine sponge *Halichondria panicea*: activation of the neuronal NMDA receptor. Environ Toxicol Pharmacol 6: 125-133
- Picton BE, Morrow CC (1994) A field guide to the nudibranchs of the British Isles. Immel Publishing, London
- Polak A, Jackel A, Noack A, Kappe R (2004) Agar sublimation test for the in vitro determination of the antifungal activity of morpholine derivatives. Mycoses 47: 184-92
- Polychronopoulos P, Magiatis P, Skaltsounis AL, Tillequin F (2001) Homarine, a common metabolite in edible Mediterranean molluscs: occurrence, spectral data and revision of a related structure. Nat Prod Lett 15:411-418
- Pomponi SA (2001) The potential for the marine biotechnology Industry. Als pdf-file aus dem Internet (www.nos.noaa.gov)

- Proksch P, Edrada RA, Ebel R (2002) Drugs from the seas-current status and microbiological applications. *Appl Microbiol Technol* 59: 125-134
- Raverty W, Thomson RH, King TJ (1977) Metabolites from sponge *Pachymatisma johnstonia*. *J Chem Soc Perk Trans 1*: 1204-1211
- Ruppert EE, Barnes RD (1994) *Invertebrate Zoology*. Sixth Edition Saunders College Publishing, New York pp 68-94
- Sarma AS, Daum T, Müller WEG (1993) Secondary metabolites from marine sponges. Ullstein Mosby Verlag, Berlin pp 1-168
- Scheuer PJ (1973) *Chemistry of marine natural products*. Academic Press, New York
- Schmitz FJ (1994) Cytotoxic compounds from sponges associated with microfauna. In: van Soest RWM, van Kempen TMG, Braekman JC (Hrsg.) *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam pp 485-496
- Schulte BA, De Nys R, Bakus GJ, Crews P, Eid C, Naylor S, Manes LV (1991) A modified allomone collecting apparatus. *J Chem Ecol* 17: 1327-1332
- Schupp PE, Eder C, Paul V, Proksch P (1999) Distribution of secondary metabolites in the sponge *Oceanapia* sp. and its implications. *Mar Biol* 135: 537-580
- Sera Y, Adachi K, Nishida F, Shizuri Y (1999) A new sesquiterpene as an antifouling substance from a Palauan marine sponge, *Dysidea herbacea*. *J Nat Prod* 62: 395-396
- Sheild CJ, Witman JD (1993) The impact of *Henricia sanguinolenta* (O.F. Mueller) (Echinodermata: Asteroidea) predation on the finger sponges, *Isodictya* spp. *J Exp Mar Biol Ecol* 166: 107-133
- StatSoft, Inc. (1997): *Statistica für Windows*, Tulsa, USA (<http://www.statsoft.com>)
- Stiefker B, Kroiher M, Berking S (2002) Induction of metamorphosis from the larval to the poly stage is similar in Hydrozoa and a subgroup of Scyphozoa (Cnidaria, Semaestomae). *Helgol Mar Res* 54: 230-236
- Storch V, Welsch U (1997) *Systematische Zoologie*. Fischer Verlag, Stuttgart pp 37-42

- Swearingen DI, Pawlik JR (1998) Variability in the chemical defense of the sponge *Chondrilla nucula* against predatory reef fishes. Mar Biol 131: 619-627
- Targett NM, Bishop SS, McConnell OYJ (1983) Antifouling agents against the benthic marine diatom, *Navicula salinicola*. Homarine from the gorgonians *Leptogorgia virgulata* and *L. setacea* and analogs. J Chem Ecol 9: 817-830
- Technologiestiftung Schleswig-Holstein (2003) Blaue Biotechnologie: Stand und Perspektiven der marinen Naturstoffe. Als pdf-file aus dem Internet (www.tsh.de)
- Thakur NL, Anil AC (2000) Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*: importance of its surface-associated bacteria. J Chem Ecol 26: 57-71
- Thevanathan RG, Gangadharan A, Veerabadran V, Manoharan A, Dhamotharan R, Nirmala M (2000) Occurrence of ureides and their role in nitrogen assimilation in marine algae. Seaweed Res Util 22: 153-157
- Thompson JE (1985) Exudation of biologically active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis* I. Biological evidence. Mar Biol 88: 23-26
- Thompson JE, Walker RP, Faulkner DJ (1985) Screening and bioassay for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego California, USA. Mar Biol 88: 11-21
- Thompson JE, Walker RP, Wratten SJ, Faulkner DJ (1982) A chemical defense mechanism for the nudibranch *Cadlina luteomarginata*. Tetrahedron 38: 1865-1873
- Tomono Y, Hirota H, Fusetani N (1998) Antifouling compounds against barnacle (*Balanus amphitrite*) larvae from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. In: Watanabe Y, Fusetani N (Hrsg.) Sponge Sciences. Springer Verlag, Berlin pp 391-398
- Torres YR, Berlinck RGS, Nascimento GGF, Fortier SC, Pessoa C, de Moraes MO (2002) Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. Toxicon 40: 885-891
- Tsoukatou M, Hellio C, Vagias C, Harvala C, Roussis V (2002) Chemical defense and antifouling activity of three Mediterranean sponges of the Genus *Ircina*. Z Naturforsch 57c: 161-171

- Uriz M, Martin D, Rosell D (1992) Relationships of biological and taxonomic characteristics to chemically mediated bioactivity in Mediterranean littoral sponges. *Mar Biol* 113: 287-297
- Uriz M, Turon X, Becerro M, Galera J (1996) Feeding deterrence in sponges. The role of toxicity, physical defenses, energetic contents, and life-history stage. *J Exp Mar Biol Ecol* 205: 187-204
- Uriz MJ, Martin D, Turon X, Ballesteros E, Hughes R, Acebal C (1991) An approach to the ecological significance of chemically mediated bioactivity in Mediterranean benthic communities. *Mar Ecol Prog Ser* 70: 175-188
- Van Alstyne KL, Paul V (1992) Chemical and structural defenses in the sea fan *Gorgonia ventalina*: Effects against generalist and specialist predators. *Coral reefs* 11: 115-159
- Van de Vyver G, Huysecom J, Braekman JC, Daloze D (1990) Screening and bioassays for toxic substances in sponges from Western Mediterranean Sea and North Brittany. *Vie milieu* 40: 285-292
- Van Soest RWM (1996) Porifera, Schwämme. In: Westheide W, Rieger R (Hrsg.) *Spezielle Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart pp 98-121
- Van Soest RWM, Braekman JC (1999) Chemosystematics of Porifera: A review. *Memoirs of the Queensland Museum* 44: 569-589
- Van Soest RWM, Picton B, Morrow C (2000) *Sponges of the North East Atlantic*. Springer Verlag, Heidelberg (CD-ROM, Windows Version 1.0)
- Waddell BP, Pawlik JR (2000) Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators. 2. Assays with sea stars. *Mar Ecol Prog Ser* 195: 133-144
- Warabi K, Zimmermann WT, Shen J, Gauthier A, Robertson M, Finlay B, van Soest R, Andersen RJ (2004) Pachymoside A - A novel glycolipid isolated from the marine sponge *Pachymatisma johnstonia*. *Can J Chem* 82: 102-112
- Wahl (1989): Marine epibiosis. Fouling and antifouling: some basis aspects. *Mar Ecol Prog Ser* 58: 175-189
- Wahl M (2001) Small scale variability of benthic assemblages: biogenic neighbourhood effects. *J Exp Mar Biol Ecol* 258: 101-114

- Wahl M, Hay ME, Enderlein P (1997) Effects of epibiosis on consumer-prey interactions. *Hydrobiologia* 335: 49-59
- Walker RP, Thompson TJ, Faulkner, DJ (1985) Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis* . 2. Chemical evidence. *Mar Biol* 88: 27-32
- Walls JT, Ritz DA, Blackman AJ (1993) Fouling, surface bacteria and antibacterial agents of four bryozoan species found in Tasmania, Australia. *J Exp Mar Biol Ecol* 169: 1-13
- Westheide W, Rieger R (1996) *Spezielle Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart pp 98-121
- Wilkinson CR (1978a) Microbial associations in sponges. 1. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar Biol* 49: 161-167
- Wilkinson CR (1978b) Microbial associations in sponges. 2. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Mar Biol* 49: 169-176
- Wilkinson CR (1978c) Microbial Associations in Sponges. 3. Ultrastructure of the in situ associations in coral reef sponges. *Mar Biol* 49: 177-185
- Würtz S (1999) *Ökologie und Bakterien aus Halichondria panicea*. Diplomarbeit, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Bremerhaven
- Young CM (2002) *Atlas of marine invertebrate larvae*. Academy Press, San Diego, California
- Zähler H (1965) *Biologie der Antibiotika*. Springer Verlag, Berlin

TAXONOMIE**HZ001SUSU*****Suberites suberia*** MONTAGU, 1818

Synonyme: *Halichondria suberea*, *H. suberica*, *Spongia suberia*, *Hymeniacidon suberea*, *Suberites domuncula*

Klassifizierung: Demospongiae, Hadromerida, Suberitidae

MORPHOLOGIE**HZ001SUSU****Habitus**

Wuchsform: globulär, fest
Oberfläche: glatt, samtig
Farbe: orange-gelb
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Tylostyl
Mikrosklenen: nicht vorhanden

Sonstiges

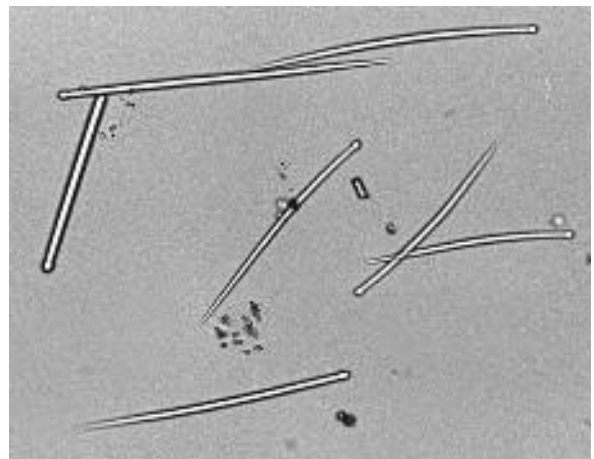
Ähnliche Art: *Suberites domuncula*
Bemerkung: Innenseite glatt, spiraliger Wuchs

FUNDDATEN**GPS 60°11.871'N 000°23.524'W**

Fundort: Colla Firth, Bressay Island (Shetland Inseln)
Datum: 07.07.2001
Sammelart: Dredge
Tiefe: 10-60 m

Habitat: sandige Flächen, unterbrochen durch felsige Flächen und Ansammlungen von Muschelschill

Assoziationen: siedelt auf Schneckenschalen, die vom Einsiedlerkrebs *Pagurus sp.* bewohnt werden



EXTRAKTIONSDATEN**HZ001SUSU*****Suberites suberia*** MONTAGU, 1818

Frischgewicht: 518,8 g

Trockengewicht: 73,9 g

Rohextrakt: 15,49 g

Rohextraktfarbe: orange

Fraktionen: Hexan = 3,45 g

Ethylacetat = 0,23 g

Butanol = 1,83 g

Wasser = 4,64 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
 HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ001SUSU****Butanolfraktion**

Trennmethode: LH20 (8 Fraktionen)

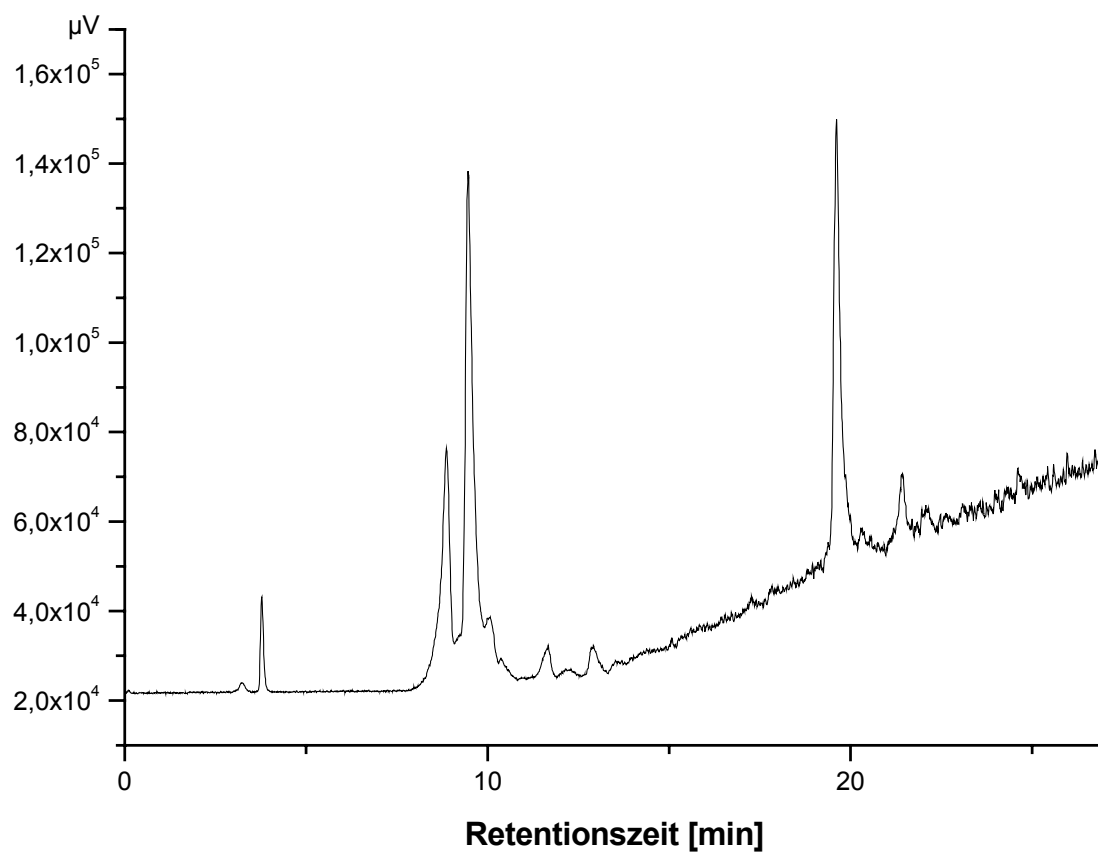
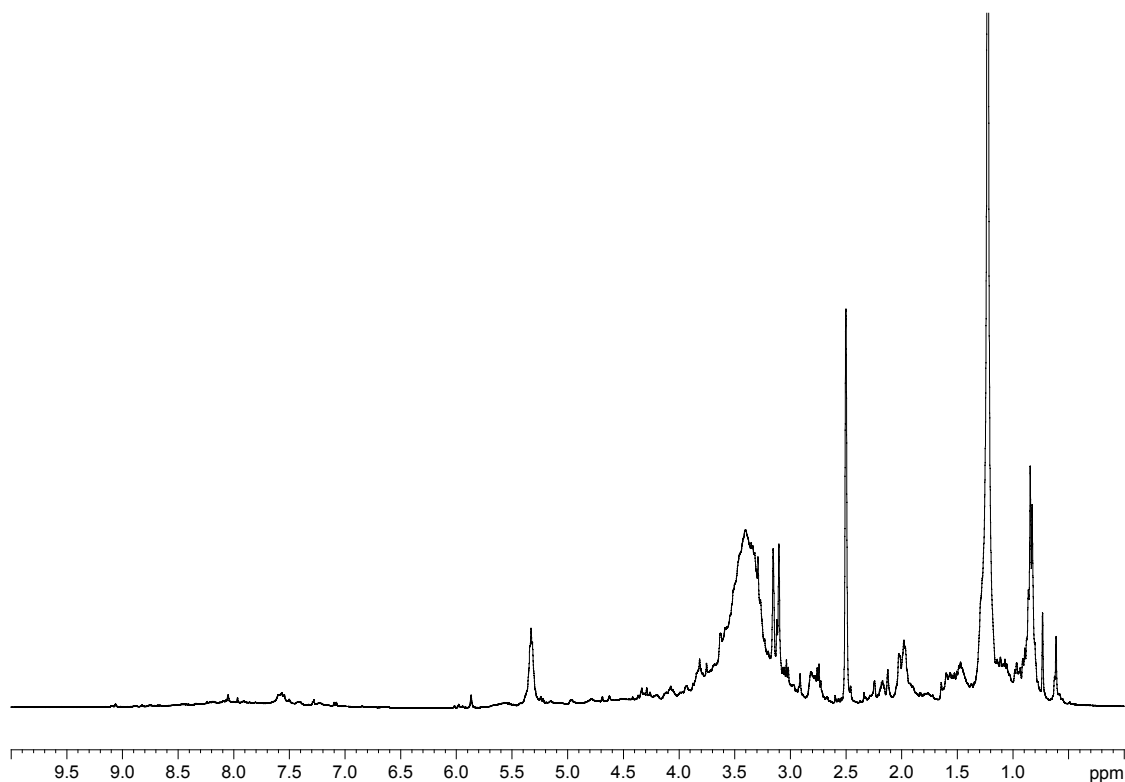
Eingesetzte Menge: 250,0 mg

Ausbeute: 90,3 %

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ001SUSU****NMR-Daten**

Probe	NMR-Experiment						
	^1H	^{13}C	COSY	^{13}C - HSQC	^{13}C - HMBC	^{15}N - HSQC	^{15}N - HMBC
HZ001BL1	+	+	-	-	-	-	-
HZ0001BL2	+	+	-	-	-	-	-
HZ0001BL6	+	+	+	+	+	-	-
HZ0001BL7	+	+	+	+	+	-	-

MS-Daten nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Suberites suberia* (HZ001SUSU)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Suberites suberia* (HZ001SUSU)**

TAXONOMIE**HZ002CLCE*****Cliona celata*** GRANT, 1826Synonyme: *Spongia terebrans*, *Halichondria celata*, *Spongia sulphurea*, *Hymeniacidon celatus*

Klassifizierung: Demospongiae, Hadromerida, Clionidae

MORPHOLOGIE**HZ002CLCE****Habitus**

Wuchsform: groß, massiv
Oberfläche: mit Papillen
Oscula: groß, sitzen vereinzelt an den Rändern
Farbe: gelb, schwarze Flecken
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Tylostyl
Mikrosklenen: Spiraster, Rhaphid

Sonstiges

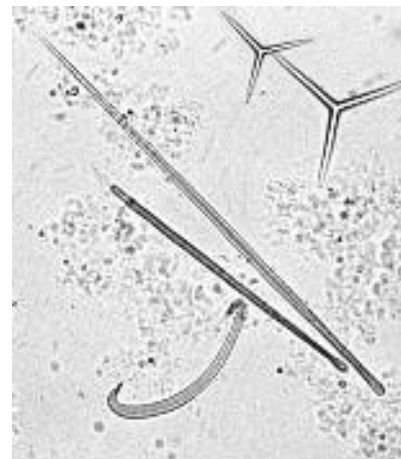
Ähnliche Art: keine
Bemerkung: dieselbe Art lebt auch in anderer Wuchsform als „Bohrschwamm“ in Schnecken- und Muschelschalen und Gestein

FUND DATEN**GPS 59°11.582'N 003°02.823'W**

Fundort: Saviskaill Bay, Rousay Island (Orkney Inseln)
Datum: 01.07.2001 und 20./27.05.2003
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 10-20 m

Habitat: auf felsigem Hartsubstrat, in Felsnischen

Assoziationen: Ophiuroidea im gesamten Wasserkanalsystem



EXTRAKTIONSDATEN**HZ002CLCE***Cliona celata* GRANT, 1826

Frischgewicht: 3870,6 g

Trockengewicht: 774,4 g

Rohextrakt: 143,2 g

Rohextraktfarbe: gelb

Fraktionen: Hexan = 21,82 g

Ethylacetat = 1,71 g

Butanol = 8,25 g

Wasser = 16,55 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
 HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ002CLCE****Butanolfraktion**

Trennmethode: LH20 (11 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 5,4 g

Ausbeute: 83,6%

Fraktion 7 LPLC (8 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 98,8 mg

Ausbeute: 95 %

Weitere Fraktionierung:

Fraktion 6 Diol-HPLC (6 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 91,9 mg

Ausbeute: 99%

Fraktion 8 Diol-HPLC (6 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 28,3 mg

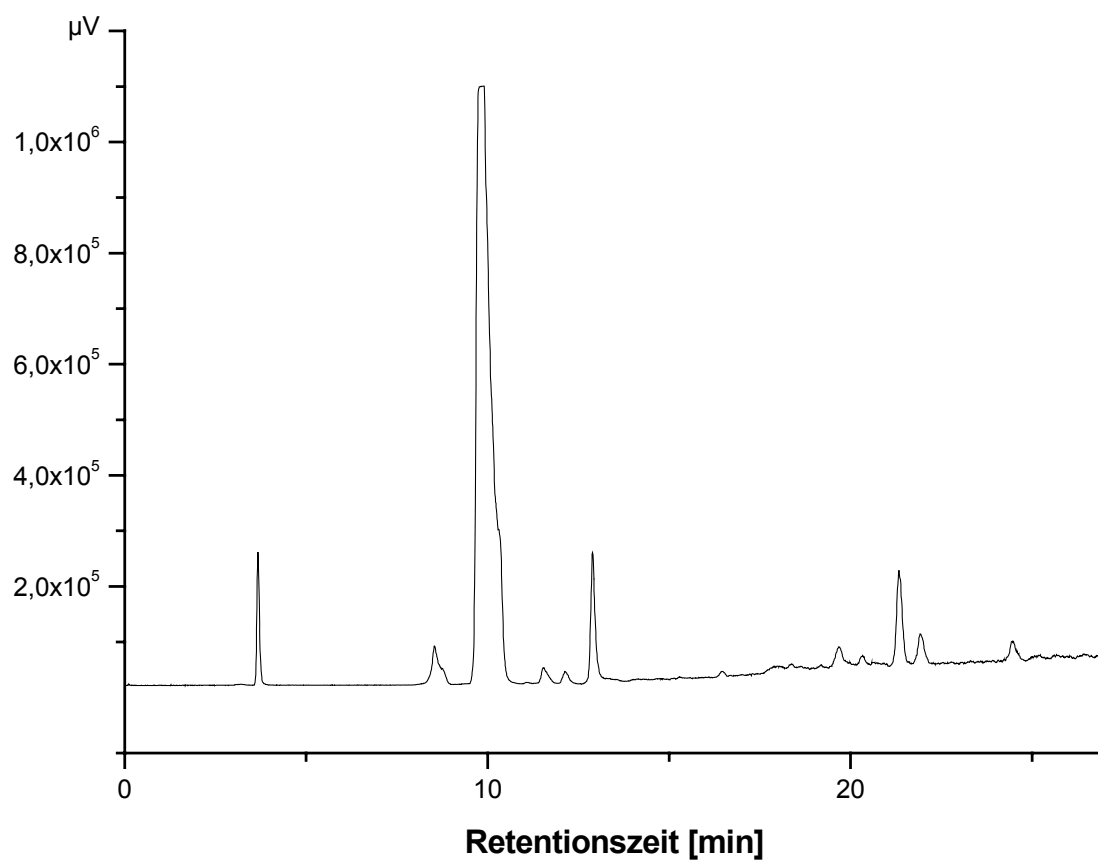
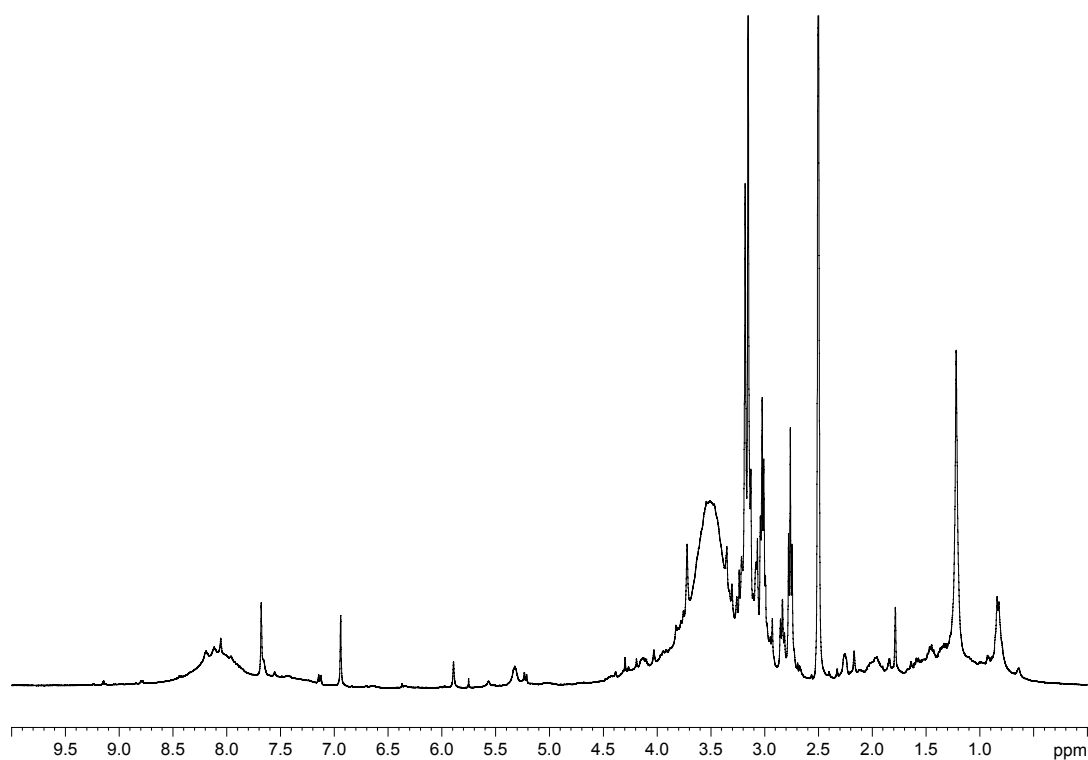
Ausbeute: 73%

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ002CLCE****NMR-Daten**

Probe	NMR-Experiment						
	^1H	^{13}C	COSY	^{13}C - HSQC	^{13}C - HMBC	^{15}N - HSQC	^{15}N - HMBC
HZ002BL2	+	+	-	-	-	-	-
HZ0BL7	+	+	-	-	-	-	-
HZ002BL8D1	+	+	-	-	-	-	-
HZ002BL8D2	+	+	+	+	+	-	-
HZ002BL8D3	+	+	-	-	-	-	-
HZ002BL8D4	+	+	-	-	-	-	-
HZ002BL6D1	+	+	-	-	-	-	-
HZ002BL6D3	+	+	-	-	-	-	-
HZ002BL6D4	+	+	-	-	-	-	-
HZ002BL6D5	+	+	-	-	-	-	-
HZ002BL7D4	+	+	-	-	-	-	-
HZ002BL7D6	+	+	-	-	-	-	-

MS-Daten

Probe	m/z theoretisch	m/z experimentell	Summenformel	Δ ppm	Substanz
HZ002BL7D4	-	218,054	-	0,1	-

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Cliona celata* (HZ002CLCE)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Cliona celata* (HZ002CLCE)**

TAXONOMIE**HZ003PAJO*****Pachymatisma johnstonia*** JOHNSTON, 1842Synonyme: *Halichondria johnstonia*, *Caminus osculosus*, *Pachymatisma normani*

Klassifizierung: Demospongiae, Astrophorida, Geodiidae

MORPHOLOGIE**HZ003PAJO****Habitus**

Wuchsform: massiv, fest
Oberfläche: grau gefärbt, glatt
Oscula: in engen Reihen unregelmäßig verteilt
Farbe: außen grau-violett, innen gelblich
Schleim: in geringen Mengen
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Strongyloxea, Orthotriaen
Mikrosklenen: Oxyaster

Sonstiges

Ähnliche Art: keine
Bemerkung: einzelne Individuen dicht mit *Fouling*-Organismen überzogen

FUNDDATEN**GPS 59°17.647'N 03°01.416'W**

Fundort: Red Nev, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 07.07.2001 und 17./18./27.05.2003
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 17-21 m

Habitat: im Sublittoral in Gebieten mit starker Wellenexposition und Gezeitenströmung auf Felssubstrat und in Felsnischen

Assoziationen: Bryozoen, Hydrozoen und *Caprella* sp.



EXTRAKTION**HZ003PAJO*****Pachymatisma johnstonia* JOHNSTON, 1842**

Frischgewicht: 713,5 g
Trockengewicht: 529,8 g
Rohextrakt: 131,1 g
Rohextraktfarbe: hellbraun
Fraktionen: Hexan = 12,98 g Ethylacetat = 29,13 g
 Butanol = 9,68 g Wasser = 18,74 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ003PAJO****Ethylacetatfraktion**

Trennmethode: LH20 (19 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 14,3 g

Ausbeute: 85,7%

weitere Trennungen:

Fraktion L2 Diol-HPLC (4 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 162,3 g

Ausbeute: 53 %

Fraktion L7 Diol-HPLC (4 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 58,8 g

Ausbeute: 61%

Fraktion L13 Diol-HPLC (2 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 67,4 g

Ausbeute: 53%

Fraktion L16-18 Diol-HPLC (3 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 99,2 g

Ausbeute: 91%

Butanolfraktion

Trennmethode: VLC (schlechte Auftrennung)

Eingesetzte Menge: 7,2 g

Ausbeute: 89%

Trennmethode: Diol-HPLC (9 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 200,8 mg

Ausbeute: 79%

weitere Trennungen:

Fraktion 5

Eingesetzte Menge: 21,6 mg

Ausbeute: 88%

STRUKTURAUFKLÄRUNG

HZ003PAJO

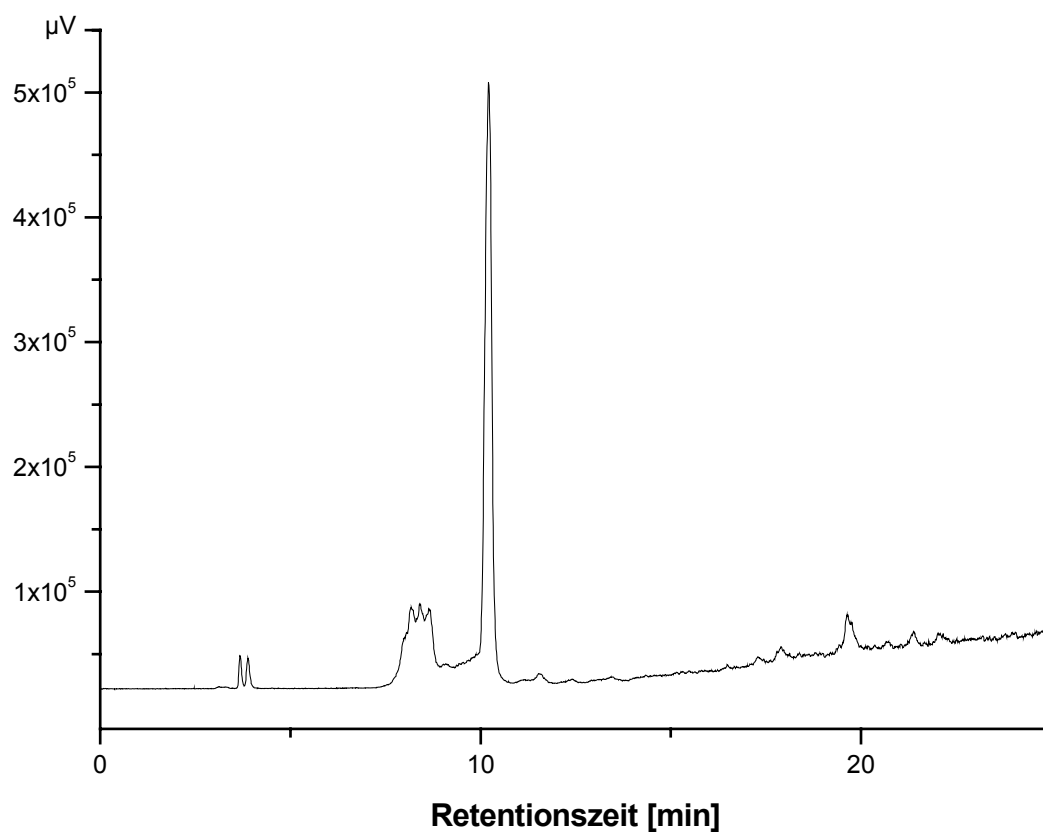
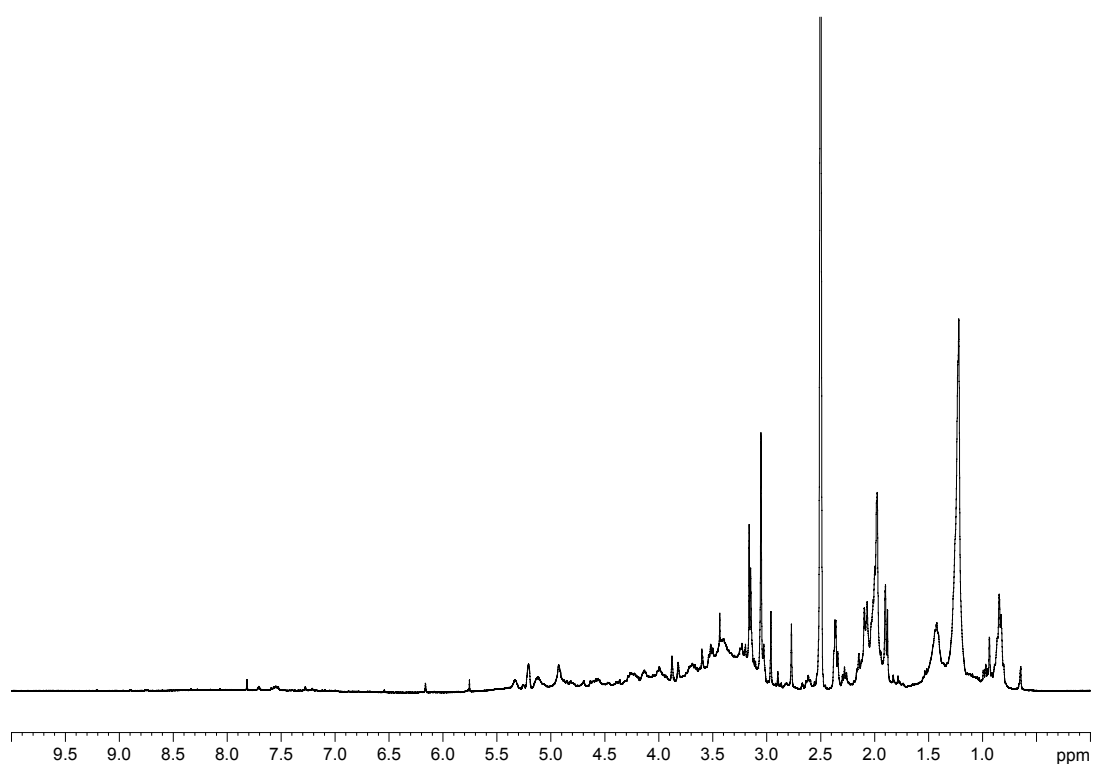
NMR-Daten

Probe	NMR-Experiment							
	¹ H	¹³ C	DEPT	COSY	¹³ C- HSQC	¹³ C- HMBC	¹⁵ N- HSQC	¹⁵ N- HMBC
HZ003BD aF ^{a)}	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ003BD3	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ003BD8	+	+	-	+	+	+	-	-
HZ003EL aF ^{a)}	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ003EL12	+	+	+	+	+	+	-	-
HZ003EL7D1	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ003EL7D2	+	+	+	+	+	+	-	-
HZ003EL7D3	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ003EL2D1	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ003EL2D2	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ003BD5I	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ003BD5III	+	+	+	+	+	+	-	-
HZ003BD5VI	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ003EL17	+	+	-	-	-	-	-	-

^{a)} alle Fraktionen

MS-Daten

Probe	m/z theoretisch	m/z experimentell	Summenformel	Δ ppm	Substanz
HZ003PAJO/B/D5/III	118,114	119,086	C ₅ H ₁₂ NO ₂	6,4	Betain (N,N,N-Trimethylglycin)
HZ003PAJO/B/D5/IV	137,099	138,054	C ₇ H ₇ NO ₂	0,2	Trigonellin
HZ003PAJO/E/L12	324,239	325,058	C ₁₄ H ₁₇ BrN ₂ O ₂	4,9	L-6-Bromohypahorin
HZ003PAJO/E/L12	324,239	325,0552	C ₁₄ H ₁₇ BrN ₂ O ₂	6,7	L-6-Bromohypahorin
HZ003PAJO/B/D8	132,078	133,105	C ₆ H ₁₄ NO ₂	3,4	N, N.N-Trimethyl-β-alanin
HZ003EL7D2	-	261,128	-	0,9	-
HZ003EL7D2	-	261,128	C ₁₉ H ₁₇ O	0,0	-
HZ003EL17	-	126,086	-	3,29	-

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Pachymatisma johnstonia* (HZ003PAJO)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Pachymatisma johnstonia* (HZ003PAJO)**

TAXONOMIE**HZ004ESFU*****Esperiopsis fucorum*** ESPER, 1794

Synonyme: sehr viele, vgl. van Soest (2000)

Klassifizierung: Demospongiae, Poecilosclerida, Mycalidae

MORPHOLOGIE**HZ004ESFU****Habitus**

Wuchsform: kissenartig, polymorph
Oberfläche: eben, leicht rau, uneben
Oscula: leicht erhoben, z.T. linear angeordnet
Farbe: orange, farblos in Alkohol
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: stark, charakteristisch

Nadeln

Makroskleren: Styl (gebogen)
Mikroskleren: Isochela (palmat)

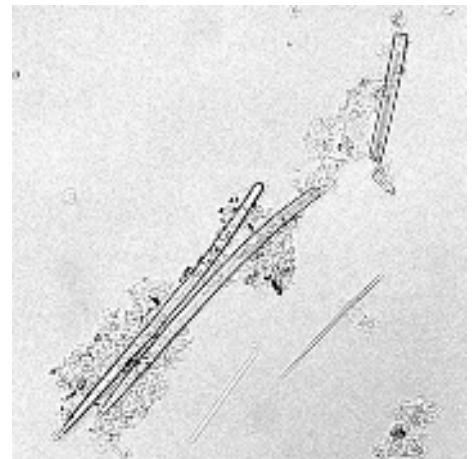
Sonstiges

Ähnliche Art: keine
Bemerkung: schnell wachsend

Funddaten**GPS 59°15.988'N 002°07.440'W**

Fundort: Tuquoy Bay, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 20.07.2001 und 18./20.05.2003
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 5-10 m

Habitat: auf Laminariencauloiden und –rhizoiden sowie auf Felsflächen

Assoziationen: *Spinther oniscoides* (vermutlich symbiontischer Polychaet), Amphipoda, Nematoda

EXTRAKTION**HZ004ESFU*****Esperiopsis fucorum*** ESPER, 1794

Frischgewicht: 2970,6 g

Trockengewicht: 329,2 g

Rohextrakt: 62,2 g

Rohextraktfarbe: rot

Fraktionen: Hexan = 10,6 g

Ethylacetat = 1,01 g

Butanol = 3,66 g

Wasser = 17,72 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ004ESFU****Ethylacetat**

Ausbeute: 81%

Trennmethode: LH20 (12 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 630,8 mg

Ausbeute: 95%

Weitere Fraktionierung:

Fraktion 2 LPLC (3 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 206,0 mg

Ausbeute: 81%

Fraktion 8 Diol-HPLC (4 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 13,3 mg

Ausbeute: 41%

Fraktion 9 Diol-HPLC (4 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 4,2 mg

Butanolfraktion

Trennmethode: LH 20 (9Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 553,6 mg

Ausbeute: 93%

Wasserfraktion

Trennmethode: LH20 (10 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 9,34 g

Ausbeute: 97%

weitere Fraktionierung:

Fraktion 4 LPLC (9 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 198,5 mg

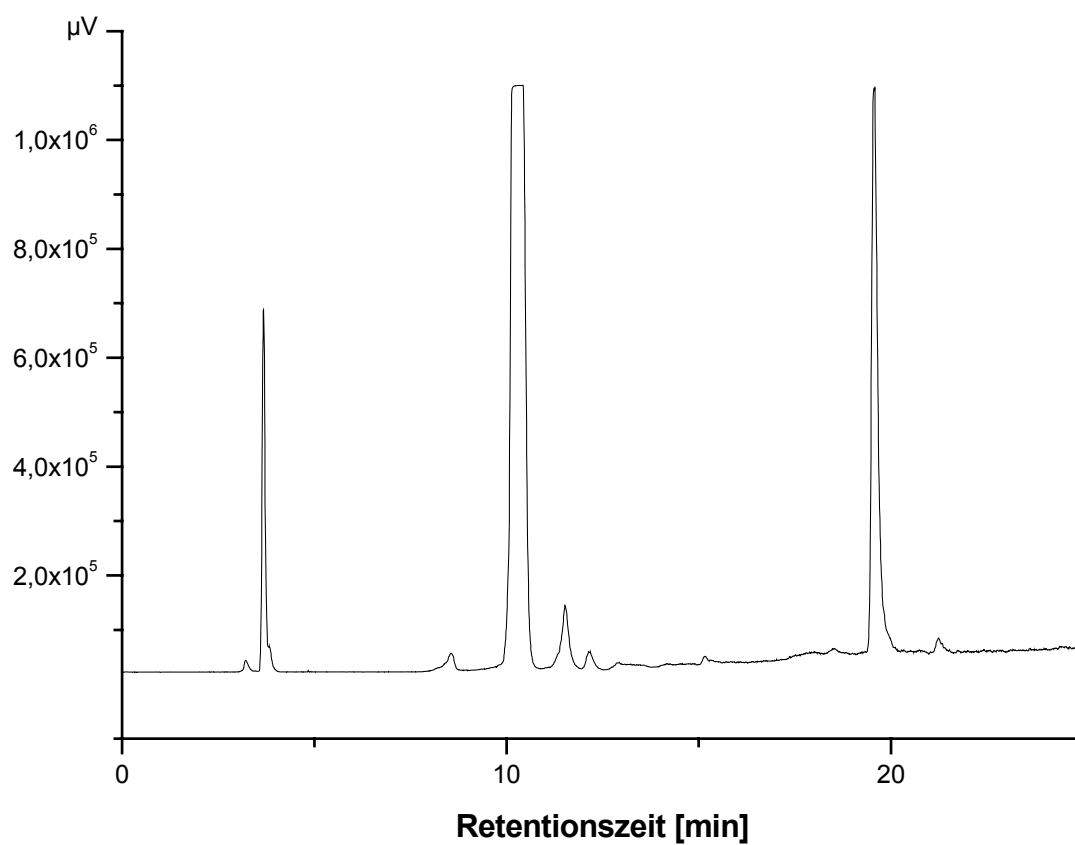
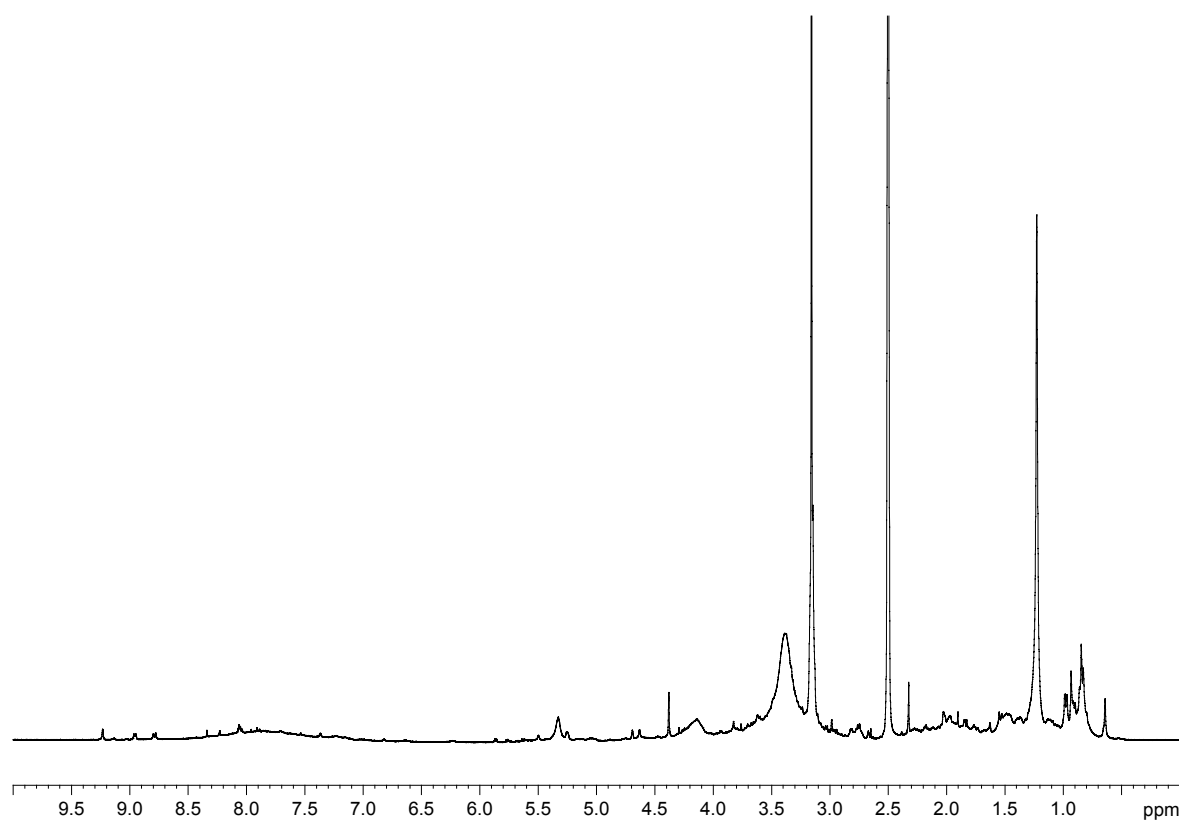
Ausbeute: 76%

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ004ESFU****NMR-Daten**

Probe	NMR-Experiment						
	¹ H	¹³ C	COSY	¹³ C- HSQC	¹³ C- HMBC	¹⁵ N- HSQC	¹⁵ N- HMBC
HZ004EL2	+	+	+	+	+	-	-
HZ004EL2D3	+	+	-	-	+	-	-
HZ0004EL7	+	+	+	+	+	-	-
HZ0004EL8	+	+	-	-	-	-	-
HZ0004EL8D1	+	+	+	+	+	-	-
HZ0004EL8D2	+	+	+	+	+	-	-
HZ0004EL9	+	+	-	-	-	-	-
HZ0004EL9D1	+	+	-	-	-	-	-
HZ0004EL9D2	+	+	-	-	-	-	-
HZ0004EL9D3	+	+	-	-	-	-	-
HZ004WL1	+	+	-	-	-	-	-
HZ004BL3	+	+	-	-	-	-	-
HZ004BL6	+	+	-	-	-	-	-
HZ004BL8	+	+	-	-	-	-	-
HZ004BL9	+	+	-	-	-	-	-

MS-Daten

nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Esperiopsis fucorum* (HZ004ESFU)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Esperiopsis fucorum* (HZ004ESFU)**

TAXONOMIE**HZ005SYCI*****Sycon ciliatum*** FABRICIUS, 1780

Synonyme: *Spongia ciliata*, *S. coronata*, *S. ananas*, *Grantia ciliata*, *Sycandra ciliata*, *S. coronata*, *Scypha ciliata*, *S. coronata*

Klassifizierung: Calcarea, Leucosolenida, Sycettidae

MORPHOLOGIE**HZ005SYCI****Habitus**

Wuchsform: aufrechte Röhre mit terminalem Osculum
Oberfläche: haarig, weich
Oscula: terminal von Spicula umsäumt
Farbe: gelblich-weiß
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Triactine, Oxea
Mikrosklenen: nicht vorhanden

Sonstiges

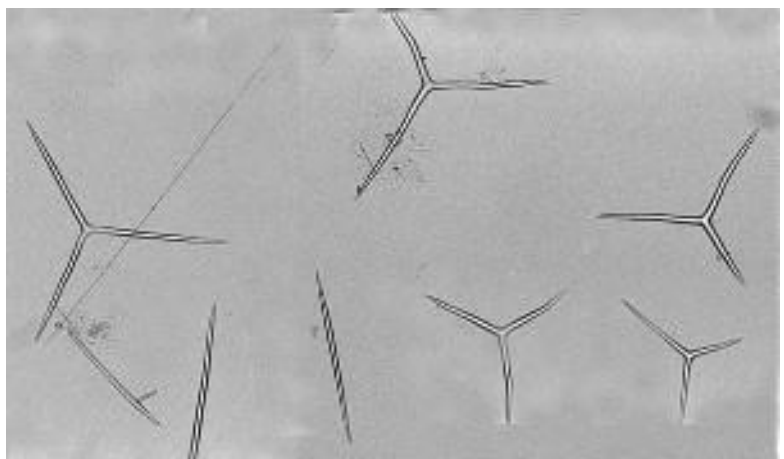
Ähnliche Art: keine
Bemerkung: saisonales Wachstum, dichte Bestände im Frühjahr, dann abnehmend; „Alterung“ durch Diatomeenbesiedlung

FUNDDATEN**GPS 59°15.988'N 002°07.440'W**

Fundort: Tuquoy Bay, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 10.07.2001
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 5-10 m

Habitat: auf Laminariencauloiden und -phylloiden

Assoziationen: in Biozönose mit Ascidiacea, Bryozoen, Rotalgen und anderen Schwämmen, mit Diatomeen besetzt



EXTRAKTION**HZ005SYCI*****Sycon ciliatum*** FABRICIUS, 1780

Frischgewicht: 520,8 g
 Trockengewicht: 63,7 g
 Rohextrakt: 11,1 g
 Rohextraktfarbe: gelbgrün
 Fraktionen: Hexan = 0,36 g Ethylacetat = 0,17 g
 Butanol = 0,65 g Wasser = 6,88 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
 HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ005SYCI****Ethylacetatfraktion**

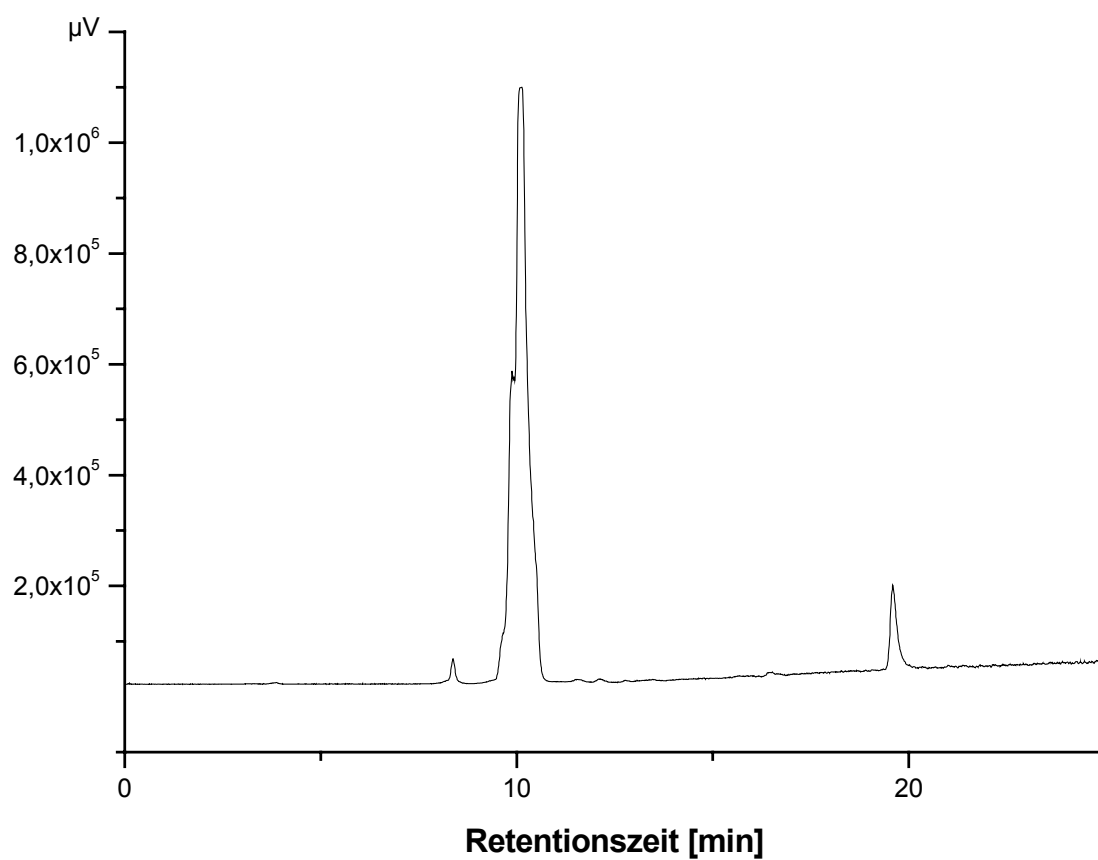
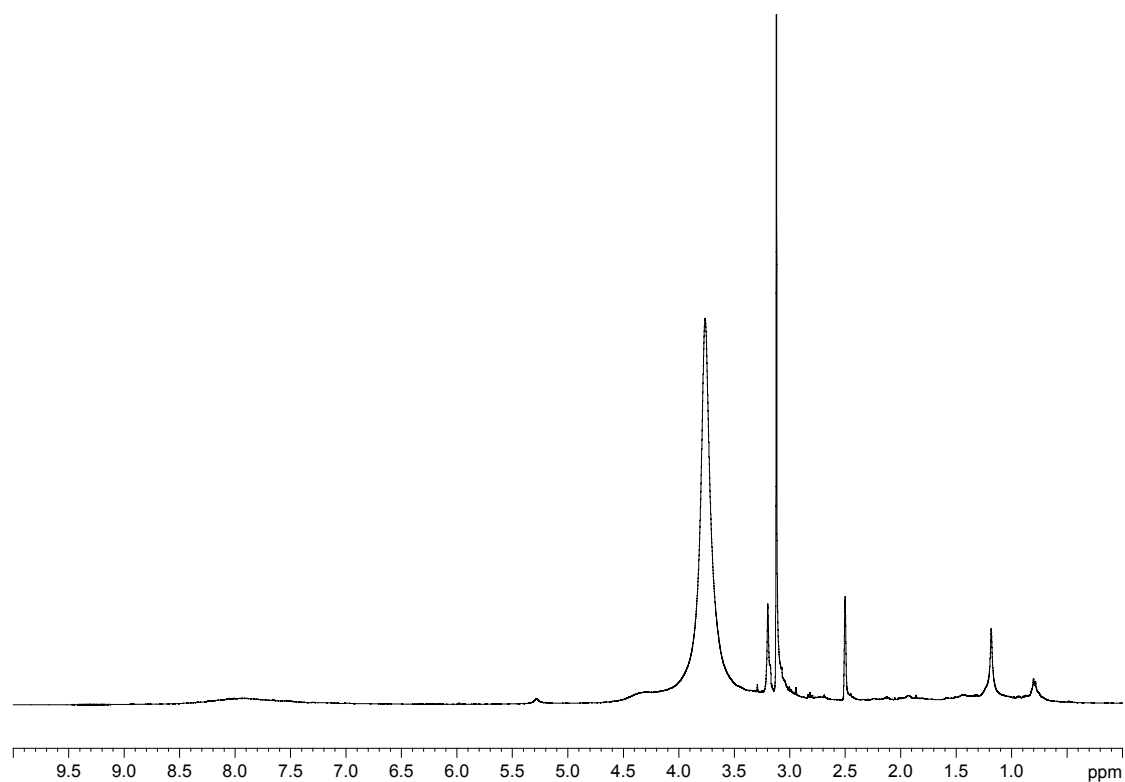
Trennmethode: Diol-HPLC (5 Fraktionen)
 Eingesetzte Menge: 80,7 mg
 Ausbeute: 93%

Butanolfraction

Trennmethode: Diol-HPLC (6 Fraktionen)
 Eingesetzte Menge: 154,6 mg
 Ausbeute: 96%

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ005SYCI****NMR-Daten**

Probe	NMR-Experiment							
	^1H	^{13}C	DEPT	COSY	^{13}C - HSQC	^{13}C - HMBC	^{15}N - HSQC	^{15}N - HMBC
HZ005BD1	+	+	+	+	+	+	-	-
HZ005BD4	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ005BD5	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ005ED2	+	+	-	-	-	-	-	-

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Sycon ciliatum* (HZ005SYCI)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Sycon ciliatum* (HZ005SYCI)**

TAXONOMIE**HZ006LECO*****Leucosolenia complicata*** MONTAGU, 1818Synonyme: *Spongia complicata*, *Ascandra complicata* Ordnung Leucosolenida

Klassifizierung: Calcarea, Leucosolenida, Leucosoleniidae

MORPHOLOGIE**HZ006LECO****Habitus**

Wuchsform: buschige, verzweigte Röhren
Oberfläche: weich, samtig
Oscula: endständig an aufrechten Röhren
Farbe: weißlich bis grau
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Triactine, Oxea unterschiedlicher Größe
Mikrosklenen: nicht vorhanden

Sonstiges

Ähnliche Art: *L. variabilis* (unverzweigte Röhren), *L. botryoides*
Bemerkung: saisonales Wachstum, Bestand im Frühjahr dichter, nimmt im Sommer ab

FUNDDATEN**GPS 59°15.988'N 002°07.440'W**

Fundort: Tuquoy Bay, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 10.07.2001 und 21.05.2003
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 5-10 m

Habitat: auf Laminariencauloiden und -phylliden

Assoziationen: in Biozönose mit Ascidiacea, Bryozoen, Rotalgen und anderen Schwämmen, wächst aber hauptsächlich zwischen Rotalgen (*Plumaria elegans*)



EXTRAKTION**HZ006LECO*****Leucosolenia complicata* MONTAGU, 1818**

Frischgewicht: 480,7 g
 Trockengewicht: 57,8 g
 Rohextrakt: 10,81 g
 Rohextraktfarbe: gelblich
 Fraktionen: Hexan = 0,25 g Ethylacetat = 0,23 g
 Butanol = 0,69 g Wasser = 6,31 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
 HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ006LECO****Rohextrakt 2**

Trennmethode: Diol-HPLC (6 Fraktionen)
 Eingesetzte Menge: 206,9 mg
 Ausbeute: 72%

Rohextrakt 4

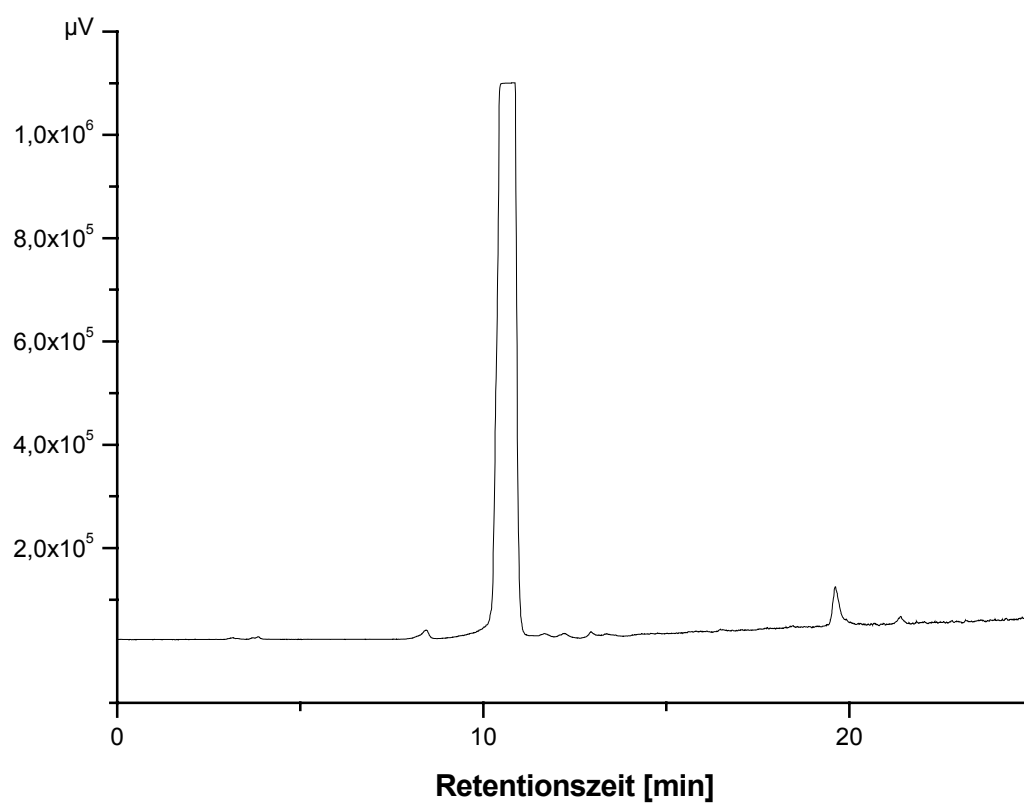
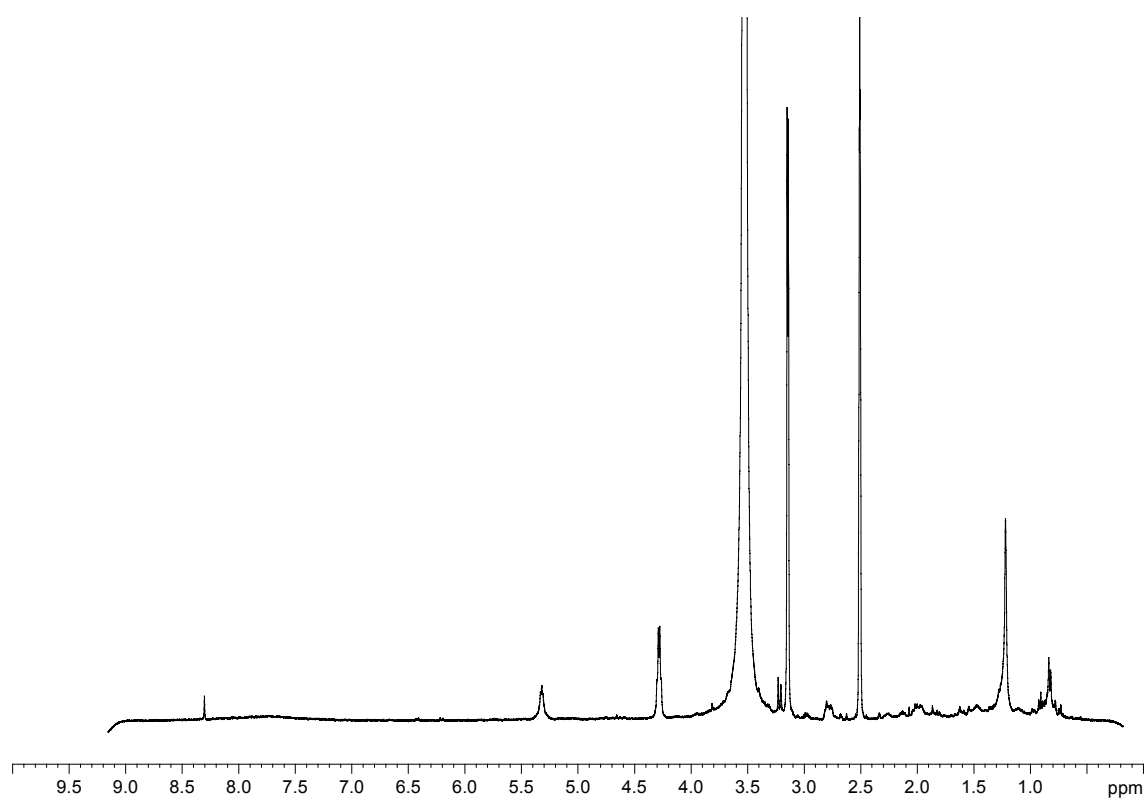
Trennmethode: Diol-HPLC (4 Fraktionen)
 Eingesetzte Menge: 487,0 mg
 Ausbeute: 68%

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ006LECO****NMR-Daten**

Probe	NMR-Experiment						
	^1H	^{13}C	COSY	^{13}C - HSQC	^{13}C - HMBC	^{15}N - HSQC	^{15}N - HMBC
HZ006R1 bis R11	+	+	-	-	-	-	-
HZ006R2D ^{a)} aF	+	+	-	-	-	-	-
HZ006R2	+	+	+	+	+	-	-
HZ006R2D1	+	+	+	+	+	+	+
HZ006R2D2	+	+	+	+	+	+	+
HZ006R2D3	+	+	+	+	+	+	+
HZ006R2D4	+	+	+	+	+	+	+
HZ006R3	+	+	+	+	+	-	-
HZ006R4	+	+	+	+	+	+	+
HZ006R4D1	+	+	+	+	+	+	+
HZ006R4D2	+	+	+	+	+	+	+
HZ006R4D3	+	+	+	+	+	+	+
HZ006R4D4	+	+	+	+	+	+	+

^{a)} alle Fraktionen**MS-Daten**

Probe	m/z theoretisch	m/z experimentell	Summenformel	Δ ppm	Substanz
HZ006R4D4	-	235,085	-	0,02	-
HZ006R4D4	-	250,116	-	0,03	-

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Leucosolenia complicata* (HZ006LECO)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Leucosolenia complicata* (HZ006LECO)**

TAXONOMIE**HZ007PHVE*****Phakellia ventilabrum*** PALLAS, 1766Synonyme: *Spongia ventilabra*, *S. scypha*

Klassifizierung: Demospongiae, Halichondrida, Axinellidae

MORPHOLOGIE**HZ007PHVE****Habitus**

Wuchsform: trichter- und lamellenartig, feste, elastische Konsistenz
Oberfläche: eben, samtig, schwach punktiert
Oscula: klein und auf der Innenseite des Bechers liegend
Farbe: graubraun
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Strongyl, Styl, Oxea
Mikrosklenen: nicht vorhanden

Sonstiges

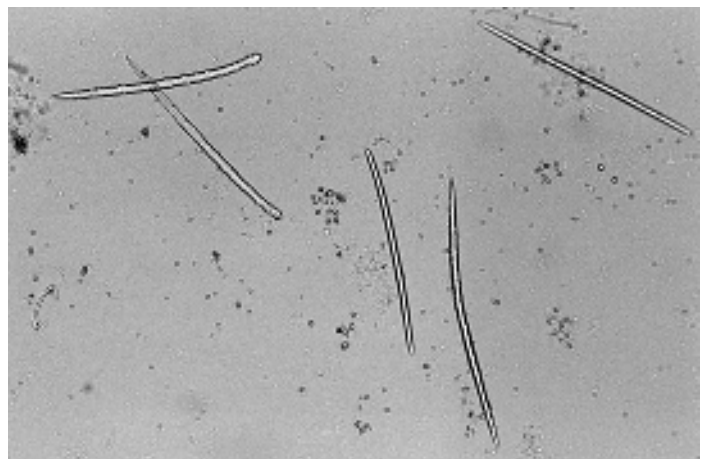
Ähnliche Art: *Axinella infundibuliformis* (Unterschiede: Spicula, Färbung, Konsistenz, Ränder)
Bemerkung: keine

Funddaten**GPS 60°11.871'N 000°23.524'W**

Fundort: östlich von Bressay Island (Shetland Inseln)
Datum: 15.07.2001 und 26.05.2003
Sammelart: Dredge
Tiefe: 50-90 m

Habitat: Tiefwasser, sandig, schlammiger Grund mit einzelnen Felsen, viel *Aphorrais* sp. (Mollusca) und Seefedern (Cnidaria, Octocorallia)

Assoziationen: mit *Axinella infundibuliformis* vergesellschaftet



EXTRAKTION**HZ007PHVE*****Phakellia ventilabrum* PALLAS, 1766**

Frischgewicht: 1150,6 g
Trockengewicht: 141,7 g
Rohextrakt: 32,7 g
Rohextraktfarbe: rotbraun
Fraktionen: Hexan = 5,00 g Ethylacetat = 3,63 g
 Butanol = 1,25 g Wasser = 11,68 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
 HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ007PHVE****Ethylacetatfraktion**

Trennmethode: Diol-HPLC (5 Fraktionen)

Eingesetzte Menge:

Ausbeute:

weitere Fraktionierung:

Fraktion 5 Diol-HPLC (4 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 59,35 mg

Ausbeute: 66%

Butanolfraktion

Trennmethode: LH20 (13 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: mg

Ausbeute:

weitere Fraktionierung:

Fraktion L2 Diol-HPLC (5 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 146,8 mg

Ausbeute: 80%

Wasserfraktion

Trennmethode: LH20 (6 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 3,4g

Ausbeute: 67%

weitere Fraktionierung:

Fraktion L3 Diol-HPLC (13
Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 53,1 mg

Ausbeute: 98%

Fraktion L6 Diol-HPLC (11
Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 45,7 mg

Ausbeute: 61%

STRUKTURAUFKLÄRUNG

HZ007PHVE

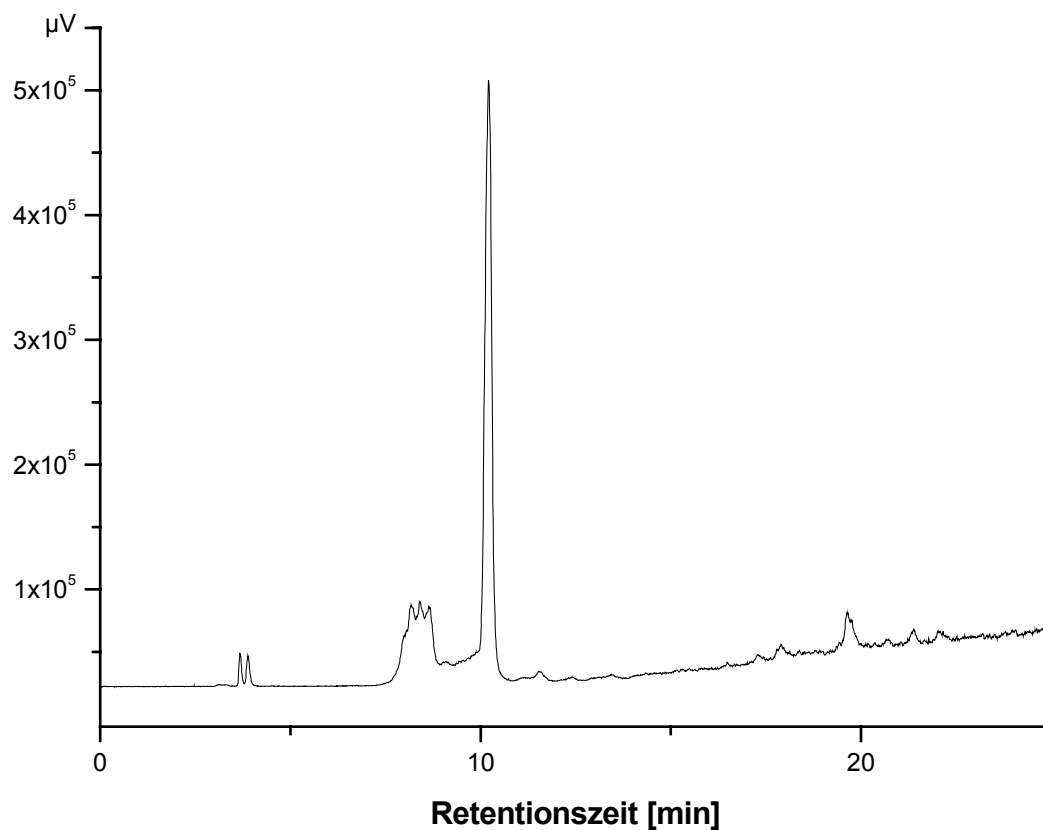
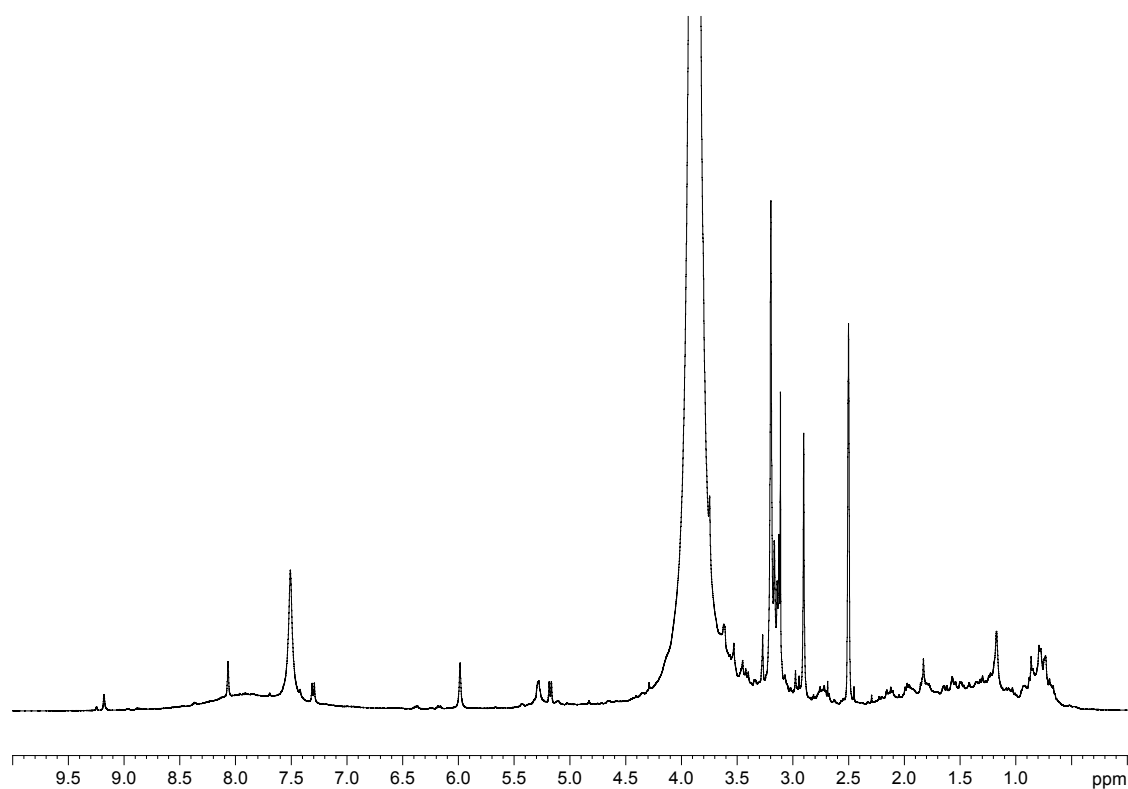
NMR-Daten

Probe	NMR-Experiment						
	¹ H	¹³ C	COSY	¹³ C- HSQC	¹³ C- HMBC	¹⁵ N- HSQC	¹⁵ N- HMBC
HZ007BL1	+	+	-	-	-	-	-
HZ007BL2	+	+	-	-	-	-	-
HZ007BL2D3	+	+	-	-	-	-	-
HZ007BL2D4	+	+	-	-	-	-	-
HZ007BL6	+	+	-	-	-	-	-
HZ007EL7D2	+	+	+	+	+	-	-
HZ007ED5D1	+	+	-	-	-	-	-
HZ007ED5D2	+	+	-	-	-	-	-
HZ007ED5D4	+	+	-	-	-	-	-
HZ007WL aF ^{a)}	+	+	-	-	-	-	-
HZ007WL3D7 bis D9 und D13	+	+	-	-	-	-	-
HZ007WL6D5 bis D9	+	+	-	-	-	-	-
HZ007WL3D7	+	+	+	+	+	-	-
HZ007WL3D13	+	+	+	+	+	+	+

^{a)}alle Fraktionen

MS-Daten

Probe	m/z theoretisch	m/z experimentell	Summenformel	Δ ppm	Substanz
HZ007BL2D3	-	412,268	-	1,5	-
HZ007W/L6D5	-	412,266	-	0,7	-
HZ007W/L6D6	-	412,268	-	0,2	-
HZ007W/L6D7	137,049	149,074	C ₇ H ₇ NO ₂	0,8	Homarin
HZ007W/L6D9			C ₇ H ₇ NO ₂		Trigonellin
HZ007W/L3D13	155,082	155,084	C ₇ H ₁₁ N ₂ O ₂	0,1	Zooanemonin

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Phakellia ventilabrum* (HZ007PHVE)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Phakellia ventilabrum* (HZ007PHVE)**

TAXONOMIE**HZ008MYRO***Myxilla rosacea* LIEBERKÜHN, 1859Synonyme: *Halichondria rosacea*, *Halichondria flabellifera*, *Dendoryx incrustans* var. *viscosa*

Klassifizierung: Demospongiae, Poecilosclerida, Myxillidae

MORPHOLOGIE**HZ008MYRO****Habitus**

Wuchsform: kissenförmig
Oberfläche: locker, wenig rau
Oscula: erhobene Enden, vereinzelt
Farbe: rötlich
Schleim: viel
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Tornot, Acanthostyl
Mikrosklenen: Chela, Sigma

Sonstiges

Ähnliche Art: *M. fimbriata*, *M. rosacea* (Unterschiede: Spicula \Rightarrow Tornot)
Bemerkung: keine

FUNDDATEN**GPS 59°15.988'N 002°07.440'W**

Fundort: Tuquoy Bay, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 08./20.07.2001
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 5-10 m

Habitat: auf Laminariencauloiden und Felssubstrat

Assoziationen: *Ophiotrix fragilis* und andere Ophiuroidea im Wasserkanalsystem

EXTRAKTION**HZ008MYRO***Myxilla rosacea* LIEBERKÜHN, 1859

Frischgewicht: 4086,6 g

Trockengewicht: 743,9 g

Rohextrakt: 55,2 g

Rohextraktfarbe: rot

Fraktionen: Hexan = 6,94 g

Ethylacetat = 0,40g

Butanol = 8,42 g

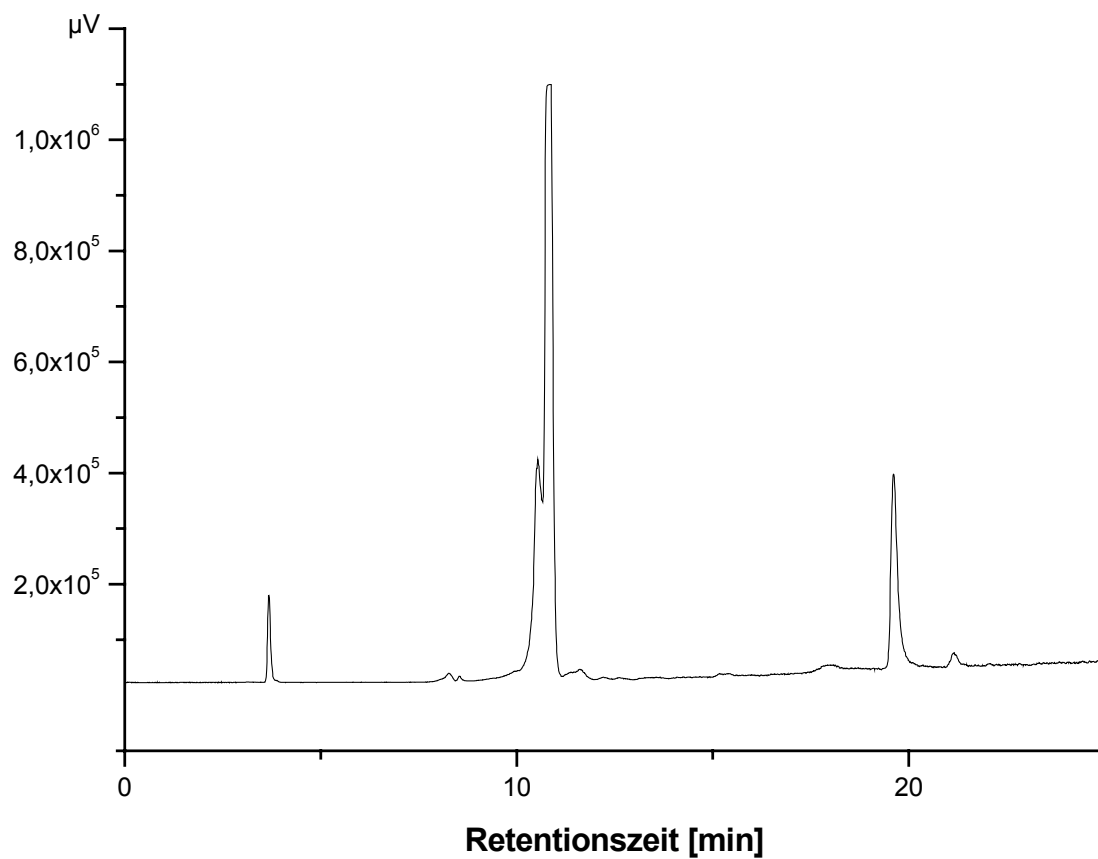
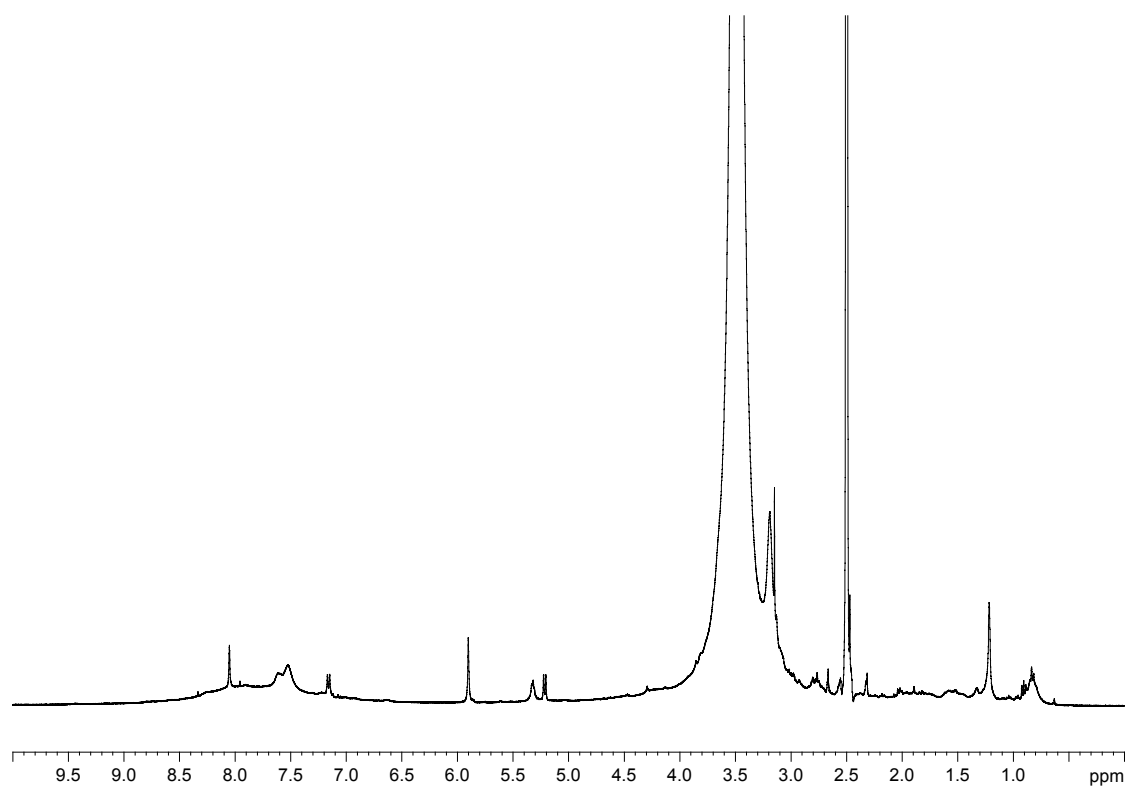
Wasser = 10,68 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ008MYRO**

Keine weitere Bearbeitung

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ008MYRO****NMR-Daten** nicht vorhanden**MS-Daten** nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Myxilla rosacea* (HZ008MYRO)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Myxilla rosacea* (HZ008MYRO)**

TAXONOMIE**HZ009MYIN*****Myxilla incrustans*** JOHNSTON, 1842Synonyme: *Isodictya tumulosa*, *Halichondria candida*, *Dendoryx incrustans*, u.a.

Klassifizierung: Demospongiae, Poecilosclerida, Myxillidae

MORPHOLOGIE**HZ009MYIN****Habitus**

Wuchsform: dicke Kissen, offene, gestrichelte Oberfläche (durchscheinende Kanäle), fest
Oberfläche: rau, mit typischen Strichmustern
Oscula: groß, erhoben
Farbe: gelb, pink
Schleim: in großen Mengen
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Tornot, Acanthostyl
Mikrosklenen: Chela, Sigmat

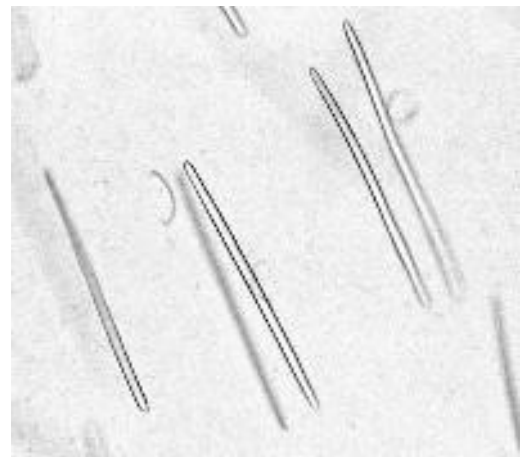
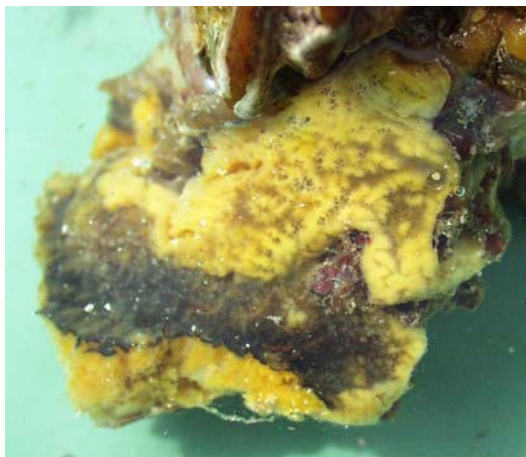
Sonstiges

Ähnliche Art: *M. fimbriata*, *M. rosacea* (Unterschiedliche Spicula \Rightarrow Tornots)
Bemerkung: keine

FUNDDATEN**GPS 59°15.988'N 002°07.440'W**

Fundort: Tuquoy Bay, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 08./20.07.2001
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 5-10 m

Habitat: auf Laminariencauloiden und Felssubstrat

Assoziationen: Hydrozoa (*Corynactis viridis*), Ophiuroidea

EXTRAKTION**HZ009MYIN***Myxilla incrustans* JOHNSTON, 1842

Frischgewicht: 1183,6 g

Trockengewicht: 168,7 g

Rohextrakt: 35,9 g

Rohextraktfarbe: gelb

Fraktionen: Hexan = 6,82 g

Ethylacetat = 0,40 g

Butanol = 1,90 g

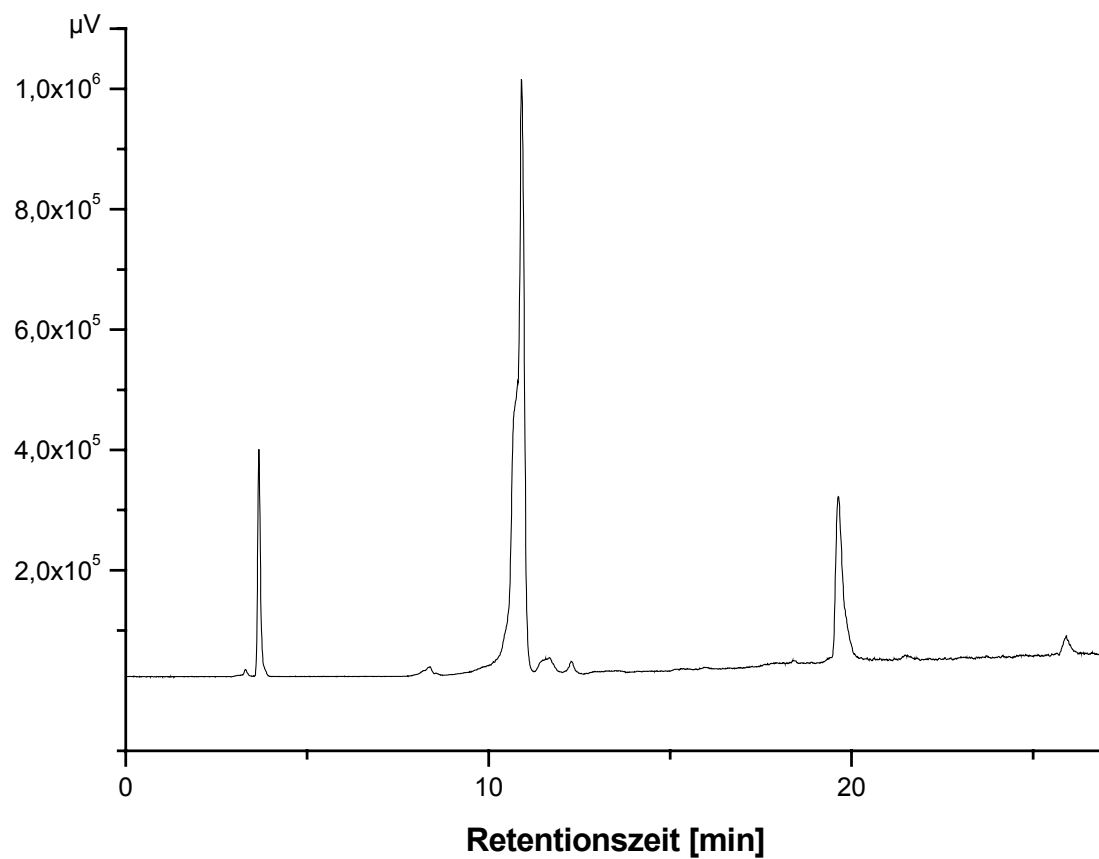
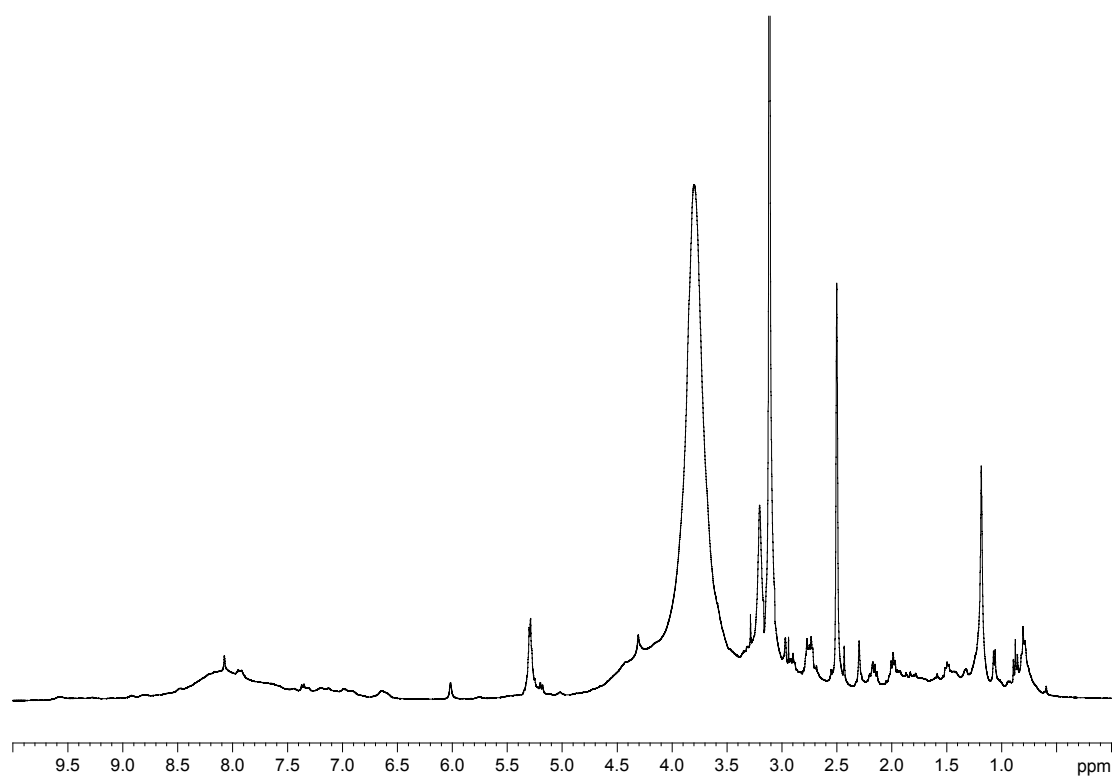
Wasser = 8,54 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ009MYIN**

Keine weitere Bearbeitung

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ009MYIN****NMR-Daten** nicht vorhanden**MS-Daten** nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Myxilla incrustans* (HZ009MYIN)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Myxilla incrustans* (HZ009MYIN)**

TAXONOMIE**HZ010HARO*****Haliclona rosea*** BOWERBANK, 1866Synonyme: *Isodictya rosea*, *I. simplex*, *I. sp.*, *Reniera sp.*, *Haliclona simplex*, *H. obscura*

Klassifizierung: Demospongiae, Haplosclerida, Chalinidae

MORPHOLOGIE**HZ010HARO****Habitus**

Wuchsform: dünne, weiche Krusten, mit vulkanartigen Erhebungen fest
Oberfläche: eben, etwas rau
Oscula: kreisförmig, auf Erhebung
Farbe: rosa-pink, hellbraun
Schleim: vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

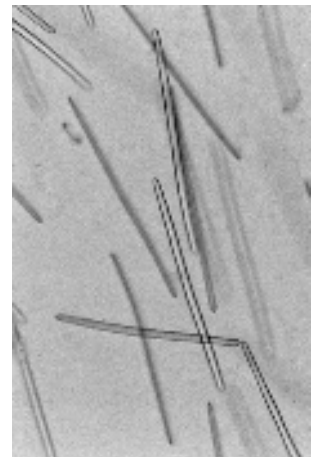
Makrosklenen: Oxea (lang)
Mikrosklenen: nicht vorhanden

Sonstiges

Ähnliche Art: *H. cinerea* (Unterschiede: Schleimfäden die beim Abbrechen von Stücken entstehen)
Bemerkung: Farbe verschwindet vollständig in Alkohol

Funddaten**GPS 59°15.988'N 002°07.440'W**

Fundort: Tuquoy Bay, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 07.07.2001
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 5-20 m

Habitat: auf Felssubstrat und Laminareincauloiden**Assoziationen:** Ophiuroidea im gesamten Wasserkanalsystem

EXTRAKTION**HZ010HARO***Haliclona rosea* BOWERBANK, 1866

Frischgewicht: 360,5 g

Trockengewicht: 59,1 g

Rohextrakt: 9,7 g

Rohextraktfarbe: orange

Fraktionen: Hexan = 0,73 g

Ethylacetat = 0,18 g

Butanol = 0,61 g

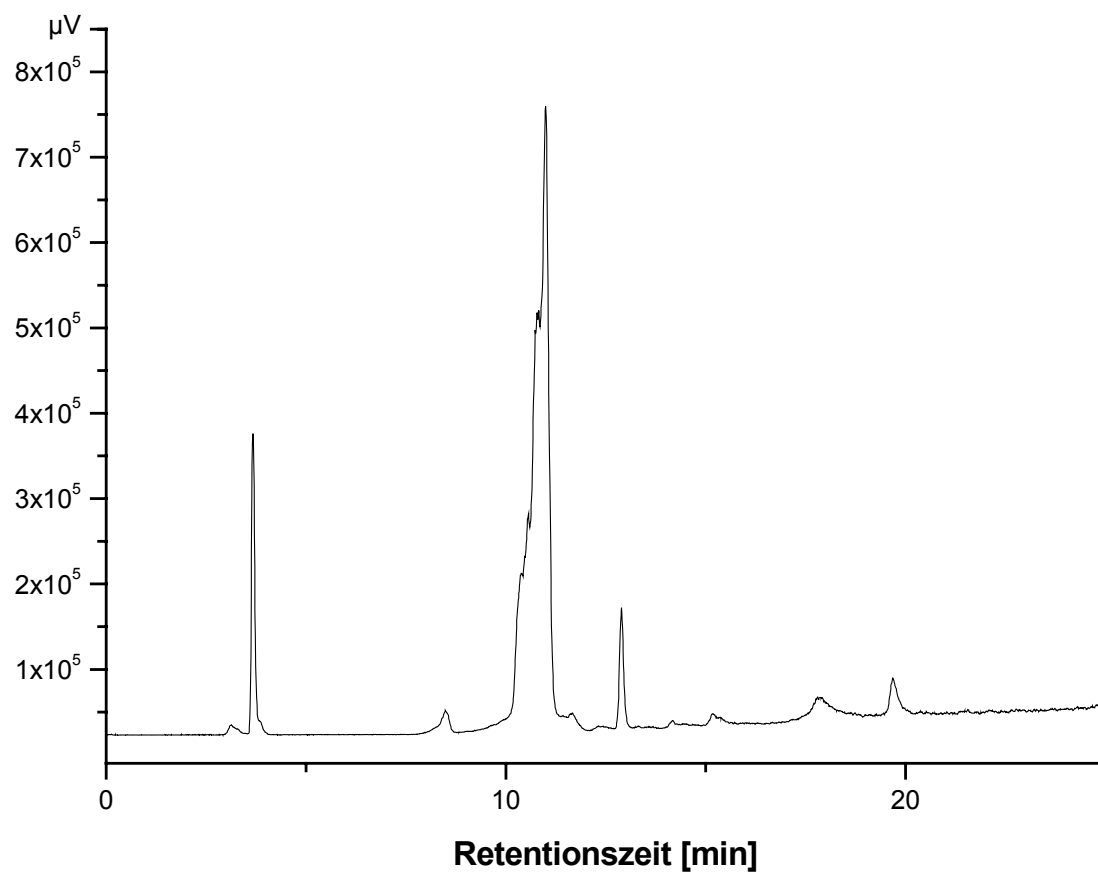
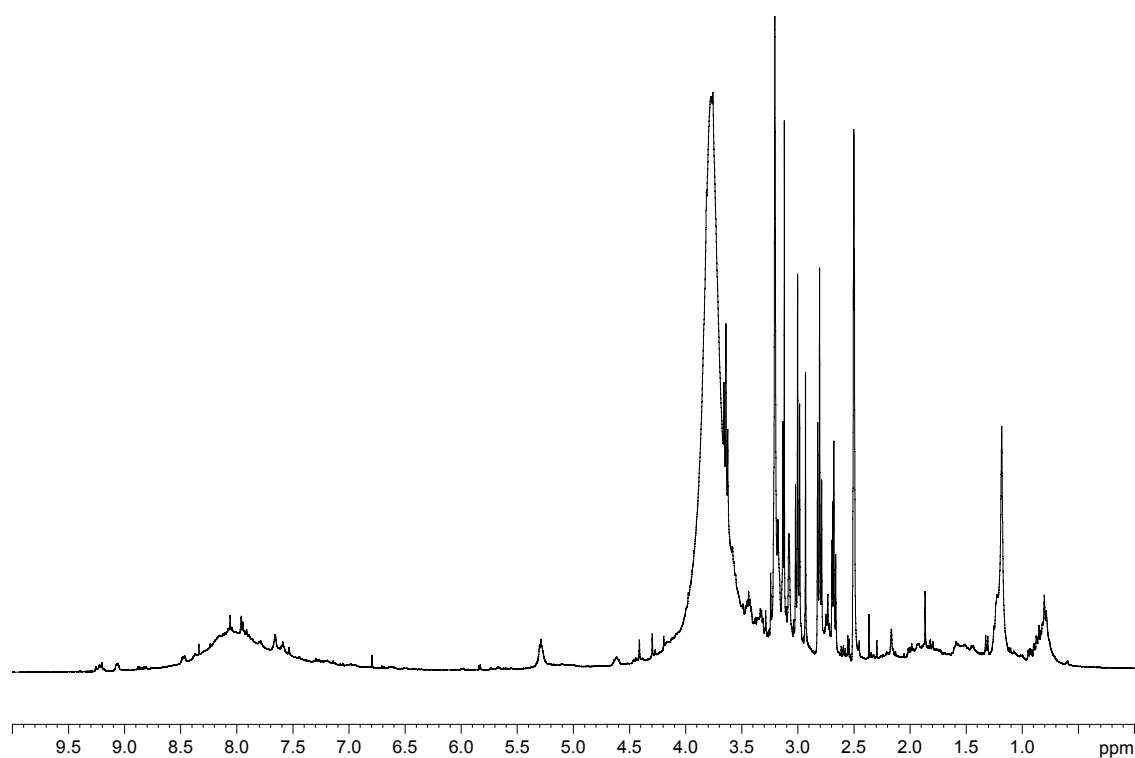
Wasser = 2,2 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ010HARO**

Keine weitere Bearbeitung

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ010HARO****NMR-Daten** nicht vorhanden**MS-Daten** nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Haliclona rosea* (HZ010HARO)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Haliclona rosea* (HZ010HARO)**

TAXONOMIE**HZ011ISPA*****Isodictya palmata*** ELLIS & SOLANDER, 1786Synonyme: *Spongia palmata*, *S. digitata*, *S. lobata*, *Halichondria palmata*, *Haliclona excelsa*

Klassifizierung: Demospongiae, Haplosclerida, Chalinidae

MORPHOLOGIE**HZ011ISPA****Habitus**

Wuchsform: handförmige, aufrechte Röhren
Oberfläche: leicht rau
Oscula: vereinzelt, entlang der Röhren
Farbe: gelb, in Alkohol grau
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Oxea, Styl, Strongyl
Mikrosklenen: palmates Isochela

Sonstiges

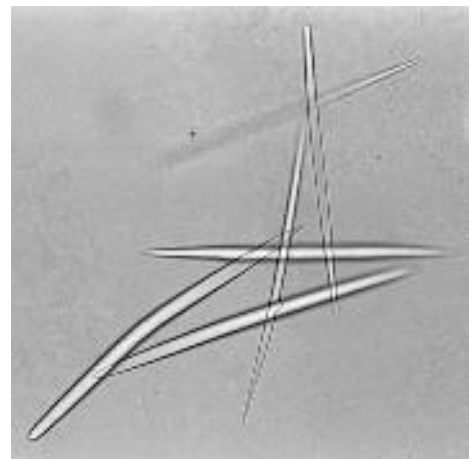
Ähnliche Art: keine
Bemerkung: keine

FUNDDATEN**GPS 60°45.711N 000°57.840 W**

Fundort: Ness of Copister, Yell Island (Shetland Inseln)
Datum: 14.07.2001
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 10-20 m

Habitat: auf dicht mit *Alcyonium* sp. bewachsenen Felsen

Assoziationen: Ophiuroidea



EXTRAKTION**HZ011ISPA***Isodictya palmata* ELLIS & SOLANDER, 1786

Frischgewicht: 815,6 g

Trockengewicht: 164,9 g

Rohextrakt: 35,9 g

Rohextraktfarbe: rot

Fraktionen: Hexan = 11,85 g

Ethylacetat = 0,44 g

Butanol = 3,17 g

Wasser = 16,57 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ011ISPA****Butanolfraktion**

Trennmethode: LH20 (25 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 1,7 g

Ausbeute: 82%

weitere Fraktionierung:

Fraktion 5 Diol-HPLC (8 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 82,2 mg

Ausbeute: 82%

Fraktion 6 Diol-HPLC (5 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 21,5 mg

Ausbeute: 62%

Fraktion 11 Diol-HPLC (6 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 21,9 mg

Ausbeute: 64%

Fraktion 12 Diol-HPLC (5 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 75,5 mg

Ausbeute: 73%

Fraktion 13 Diol-HPLC (9 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 47,0 mg

Ausbeute: 93%

Fraktion 16-18 Diol-HPLC (4 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 41,5 mg

Ausbeute: 65%

Wasserfraktion

Trennmethode: Diol-HPLC (9 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 592,8 mg

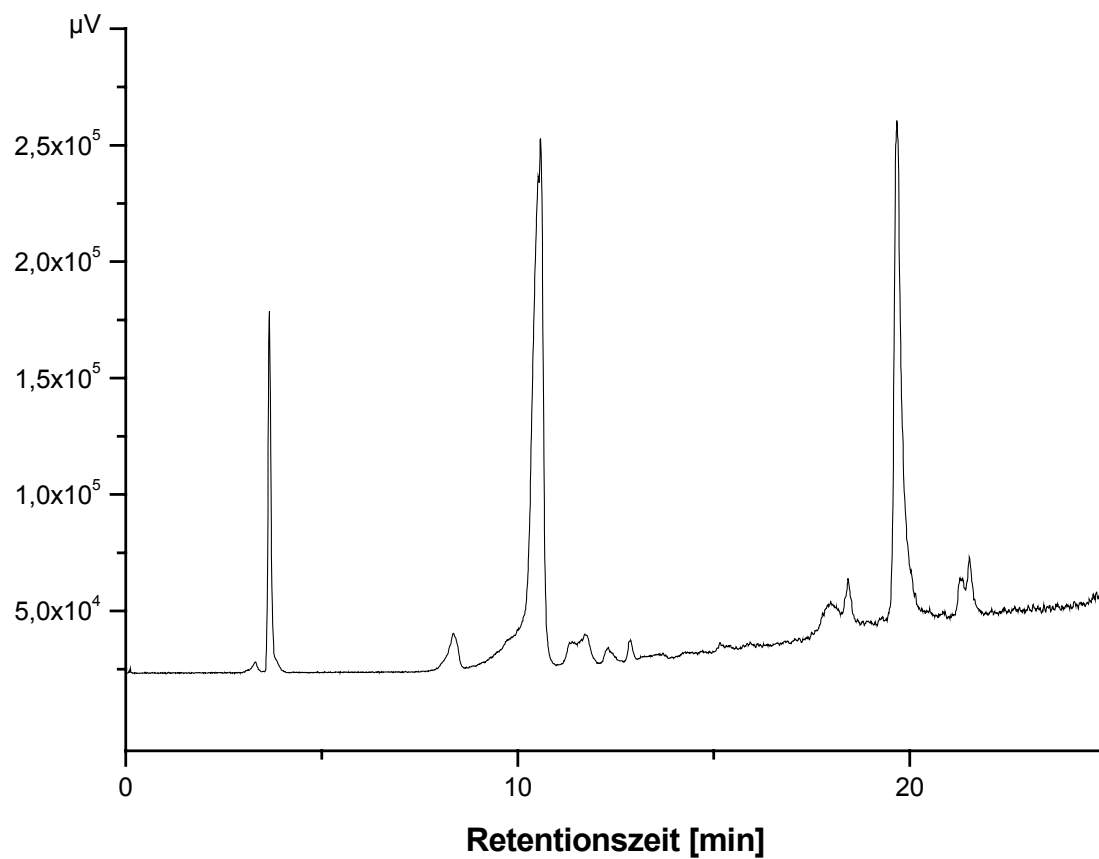
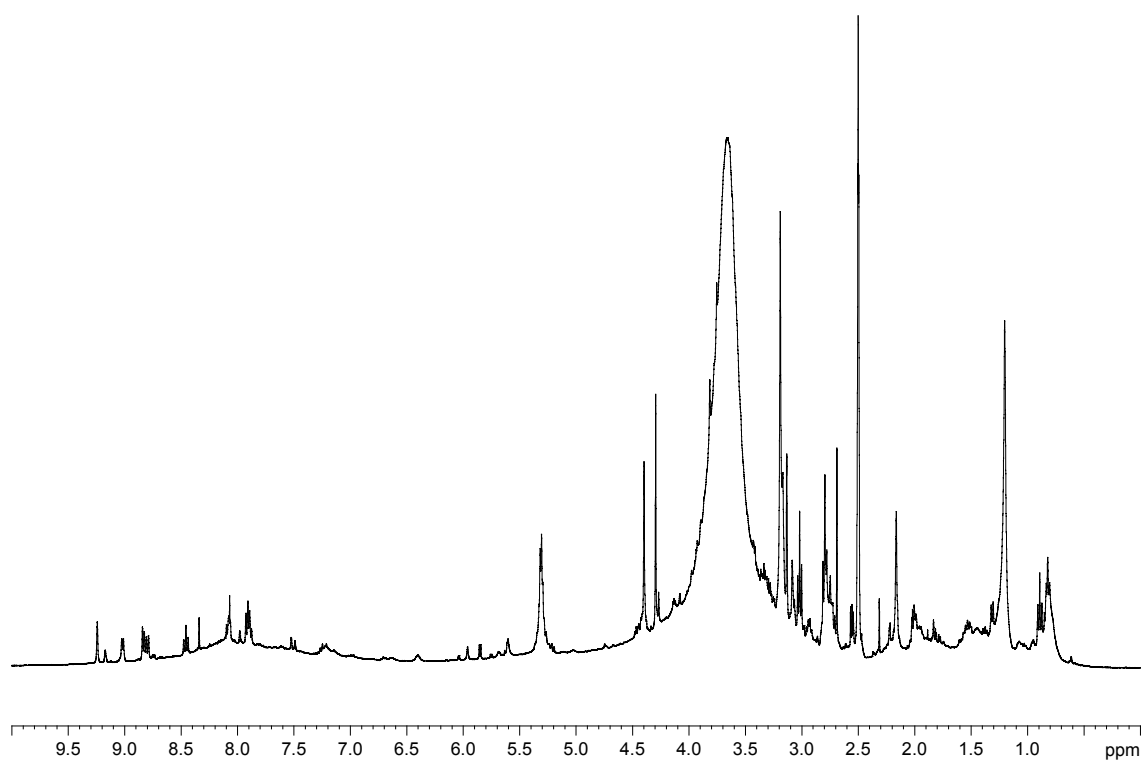
Ausbeute: 84%

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ011ISPA****NMR-Daten**

Probe	NMR-Experiment						
	¹ H	¹³ C	COSY	¹³ C- HSQC	¹³ C- HMBC	¹⁵ N- HSQC	¹⁵ N- HMBC
HZ011WD ^{a)} aF	+	+	-	-	-	-	-
HZ0011WD3	+	+	+	+	+	-	-
HZ0011WD8	+	+	+	+	+	+	+
HZ0011BL5	+	+	-	-	-	-	-
HZ0011BL6	+	+	-	-	-	-	-
HZ0011BL	+	+	+	+	+	-	-
HZ011BL13D6	+	+	+	+	+	-	-
HZ011BL13D8	+	+	+	+	+	-	-
HZ011BL16-18D1	+	+	+	+	+	-	-
HZ011BL16-18D2	+	+	+	+	+	-	-
HZ011BL16-18D3	+	+	-	-	-	-	-

^{a)} alle Fraktionen**MS-Daten**

Probe	m/z theoretisch	m/z experimentell	Summenformel	Δ ppm	Substanz
HZ011ISPA/B/L20 HZ011ISPA /W/D1	268,134	269,086	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	0,3	Inosin
HZ011ISPA/B/L13/D6	137,099	138,056	C ₇ H ₇ NO ₂	4,4	Trigonellin
HZ011ISPA/B/L13/D8	137,099	-	C ₇ H ₇ NO ₂	-	Homarin
HZ011ISPA /W/D3	-	158,58	-	-	-
HZ011ISPA /W/D6	137,099	137,054	C ₇ H ₇ NO ₂	0,16	Trigonellin
HZ011ISPA /W/D8	-	252,146	C ₁₁ H ₁₈ N ₅ O ₂	1,7	-
HZ011BL16-18D1	-	151,083	-	0,1	-

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Isodictya palmata* (HZ011ISPA)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Isodictya palmata* (HZ011ISPA)**

TAXONOMIE**HZ012HAPA*****Halichondria panicea*** PALLAS, 1766

Synonyme: sehr viele, vgl. van Soest (2000)

Klassifizierung: Demospongiae, Halichondrida, Halichondriidae

MORPHOLOGIE**HZ012HAPA****Habitus**

Wuchsform: variabel, dicke Krusten, kissenartig oder verästelt, hier: kissenartig
Oberfläche: glatt, feste, aber krümelige Konsistenz
Oscula: auf vulkanartigen Erhebungen
Farbe: gelb, grünlich
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: unangenehm, stechend

Nadeln

Makrosklerin: Oxea
Mikrosklerin: nicht vorhanden

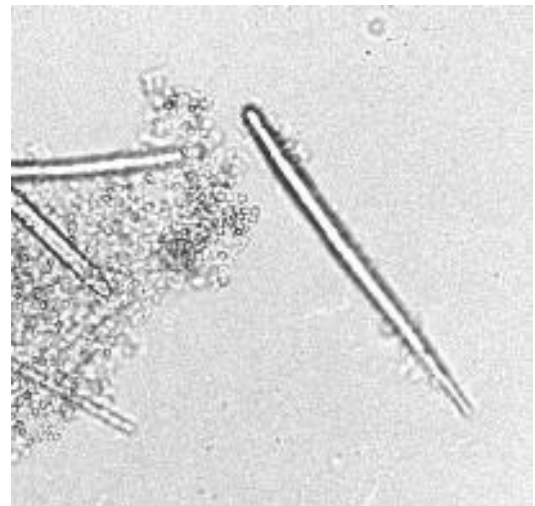
Sonstiges

Ähnliche Art: *Halichondria bowerbanki*
Bemerkung: sehr variable Wuchsform

FUNDDATEN**GPS 59°15.988'N 002°07.440'W**

Fundort: Tuquoy Bay, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 10.07.2001
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 5-10 m

Habitat: Auf Felsen und Laminariencauloiden

Assoziationen: in enger Nachbarschaft zu *Haliclona* sp., teilweise puzzleartig verzahnt, zahlreiche Invertebraten, prädatorische Nudibranchia (*Archidoris pseudoargus*)

EXTRAKTION**HZ012HAPA***Halichondria panicea* PALLAS, 1766

Frischgewicht: 1702,1 g

Trockengewicht: 742,6 g

Rohextrakt: 26,4 g

Rohextraktfarbe: orange

Fraktionen: Hexan = 10,46 g

Ethylacetat = 0,19 g

Butanol = 4,26 g

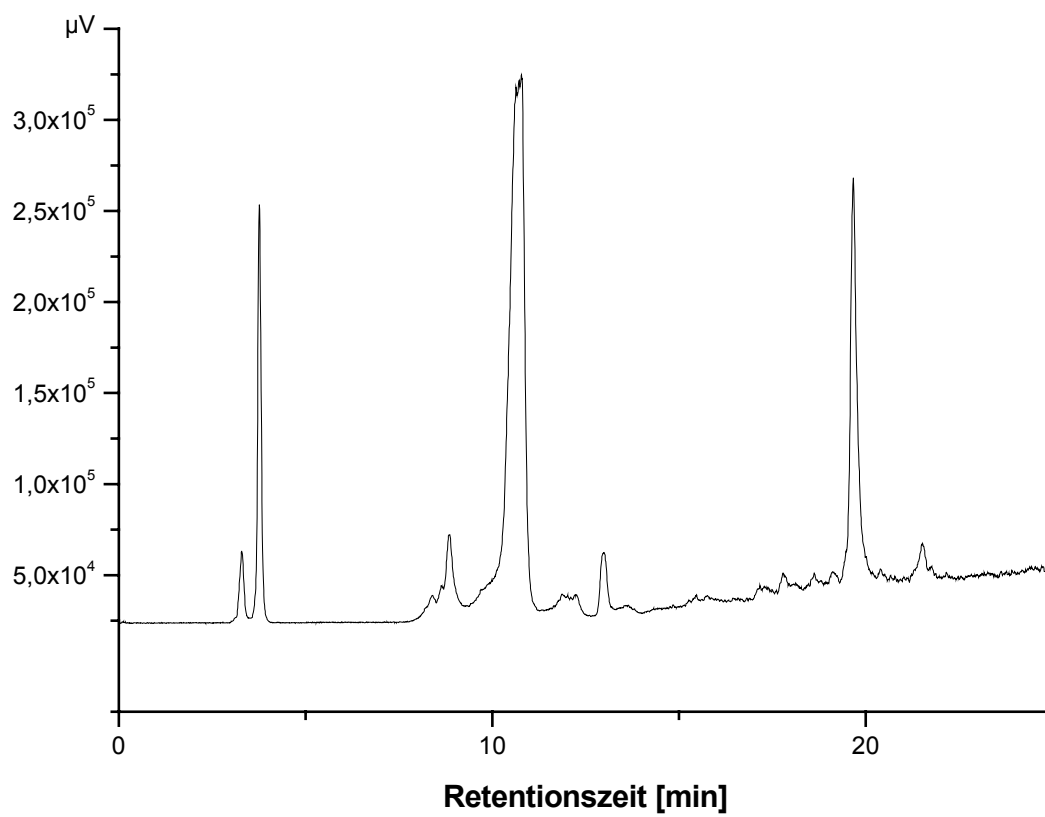
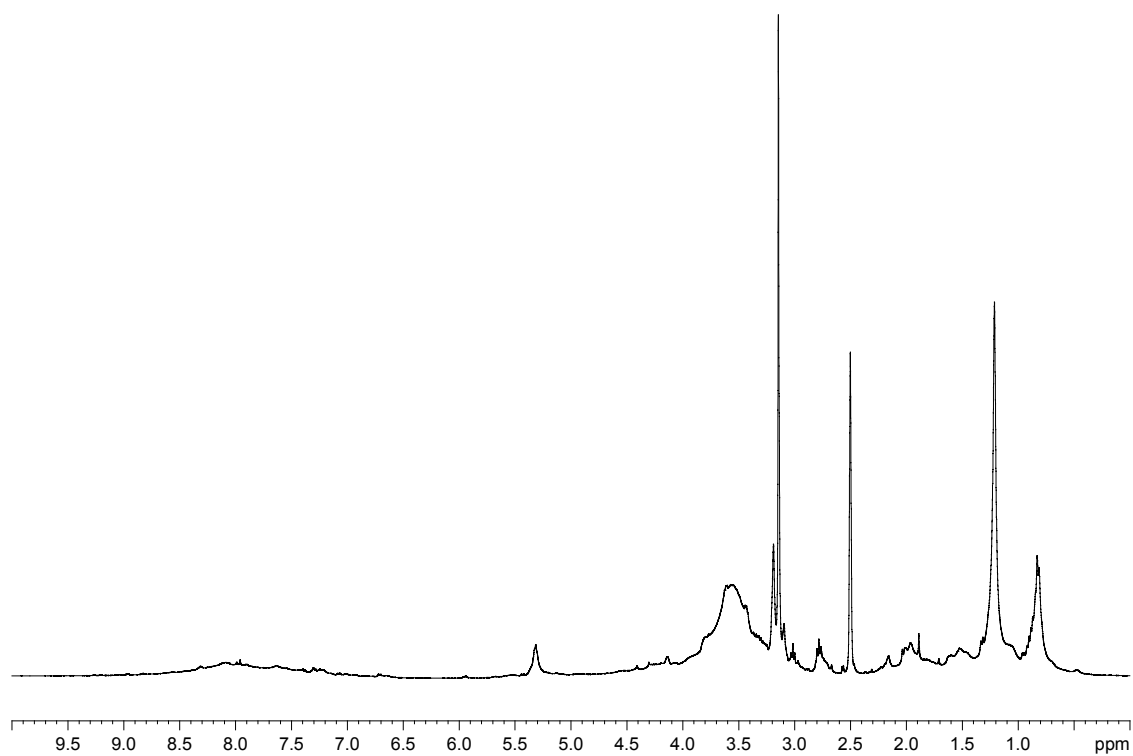
Wasser = 6,18 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ012HAPA**

Keine weitere Bearbeitung

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ012HAPA****NMR-Daten** nicht vorhanden**MS-Daten** nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Halichondria panicea* (HZ012HAPA)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Halichondria panicea* (HZ012HAPA)**

TAXONOMIE**HZ013TEZE*****Tetilla zetlandica*** CARTER, 1872Synonyme: *Tethya zetlandica*, *Tethya cranium*, *Craniella zetlandica*, *Thetyopsilla zetlandica*,

Klassifizierung: Demospongiae, Spirophorida, Tetillidae

MORPHOLOGIE**HZ013TEZE****Habitus**

Wuchsform: rund, eiförmig
Oberfläche: rau, stachelig, Nadeln ragen durch das Pinacoderm nach außen
Oscula: ein einziges an der Spitze (Apex)
Farbe: gelblich, weiß
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Oxea, Protriaen, Anatriaen
Mikrosklenen: nicht vorhanden

Sonstiges

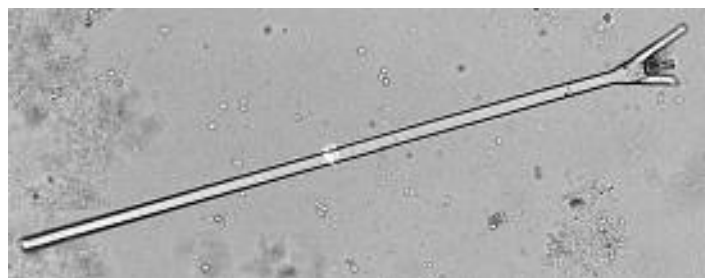
Ähnliche Art: *Tethya aurantium*, *Tetilla cranium* (mit Sigmaspire)
Bemerkung: radiale Struktur

Funddaten**GPS 60°11.871'N 000°23.524'W**

Fundort: östlich von Bressay Island (Shetland Inseln)
Datum: 15.07.2001
Sammelart: Dredge
Tiefe: 50-90 m

Habitat: Tiefwasser, sandig, schlammiger Grund mit einzelnen Felsen, viel *Aphorrais* sp. (Mollusca) und Seefedern (Cnidaria, Octocorallia)

Asoziationen: vergesellschaftet mit *Axinella infundibuliformis* und *Phakellia ventilabrum*, soll sogar in diesen becherförmigen Schwämmen sitzen



EXTRAKTION**HZ013TEZE***Tetilla zetlandica* CARTER, 1872

Frischgewicht: 42,5 g

Trockengewicht: 12,2 g

Rohextrakt: 1,1 g

Rohextraktfarbe: farblos

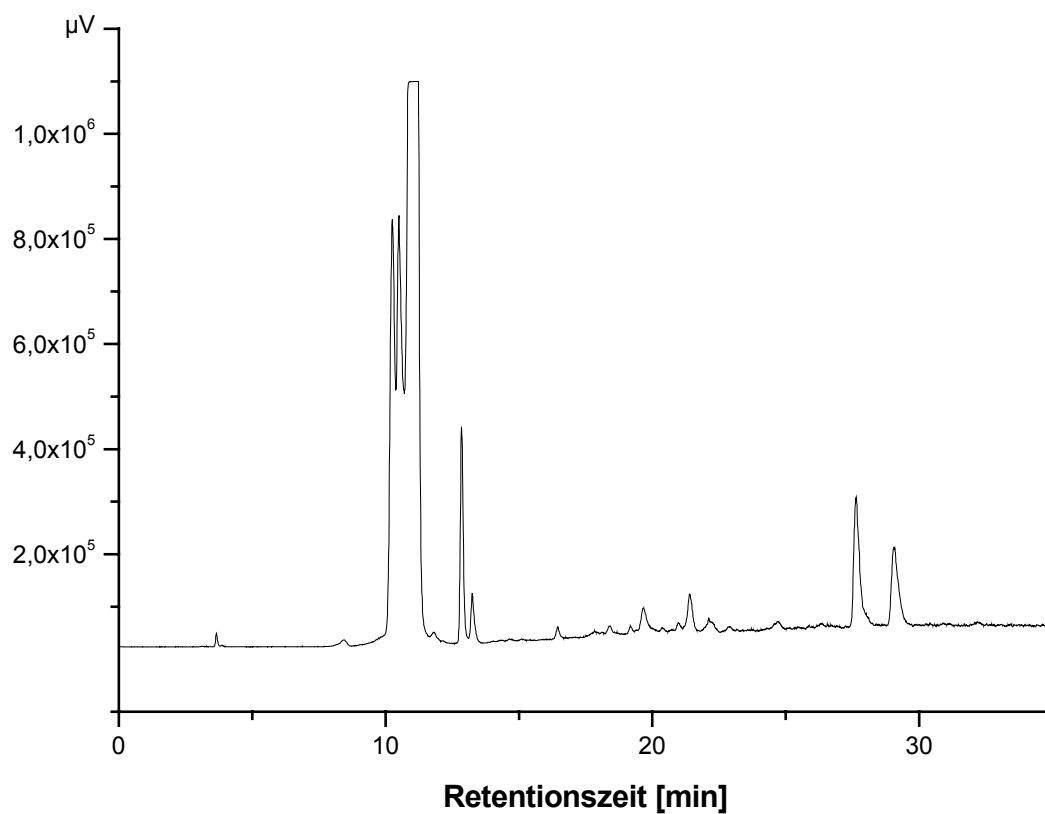
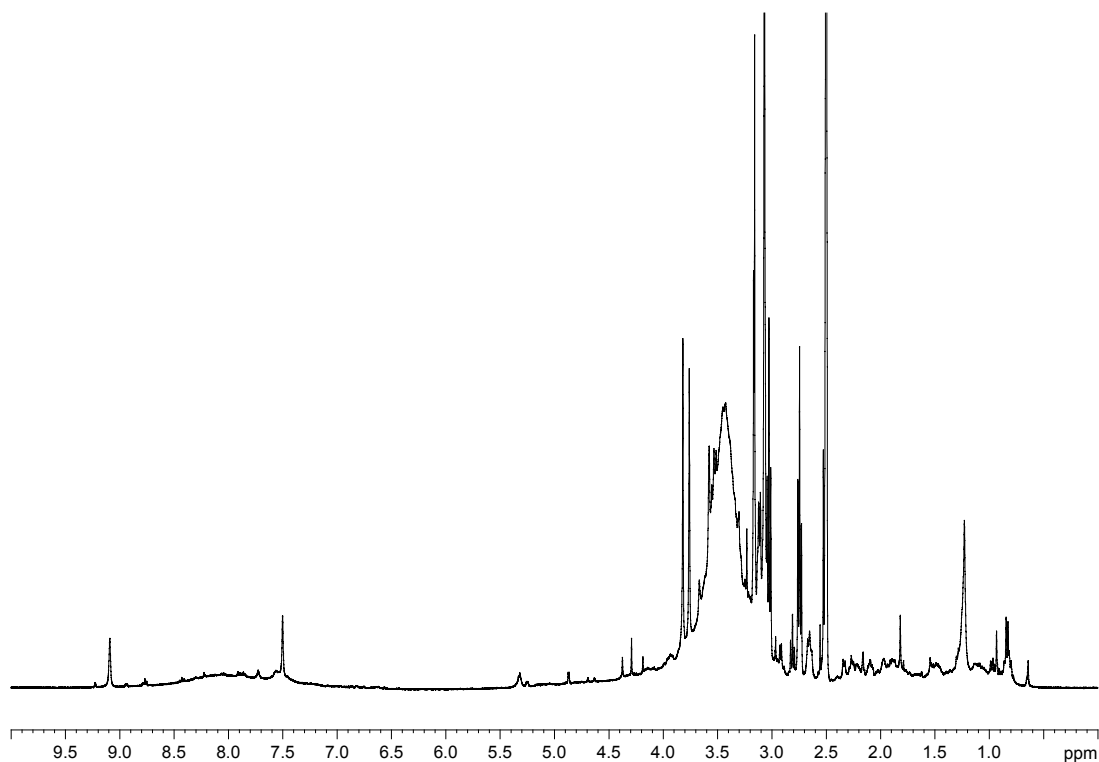
Fraktionen: -

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für den Rohextrakt
HPLC mittels RP- und Diolsäule für den Rohextrakt

ISOLIERUNG**HZ013TEZE**

Keine weitere Bearbeitung

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ013TEZE****NMR-Daten** nicht vorhanden**MS-Daten** nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Tetilla zetlandica* (HZ013TEZE)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Tetilla zetlandica* (HZ013TEZE)**

TAXONOMIE**HZ016HACI*****Haliclona cinerea*** GRANT, 1826

Synonyme: *Spongia cancellata*, *Spongia cinerea*, *Isodictya cinerea*, *Isodictya sp.*, *Chalina montagui*

Klassifizierung: Demospongiae, Haplosclerida, Chalinidae

MORPHOLOGIE**HZ016HACI****Habitus**

Wuchsform: krustenförmige, dicke Kissen rund um Laminariencauloide
Oberfläche: weich, fest, schleimig
Oscula: bräunlich, violett
Farbe: rosa-pink, hellbraun
Schleim: bei Verletzung Massenabsonderung der charakteristischen Schleimfäden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Oxea (schlank), teilweise Strongylot
Mikrosklenen: nicht vorhanden

Sonstiges

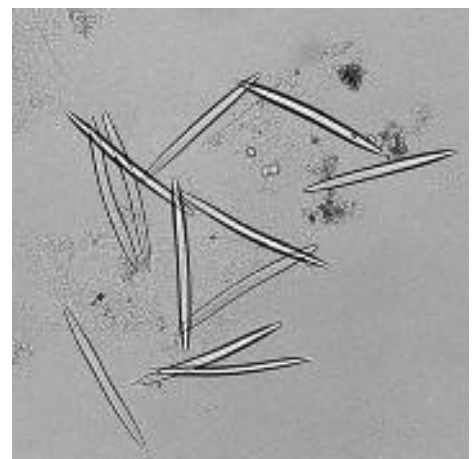
Ähnliche Art: *Haliclona viscosa*
Bemerkung: häufige Art \Rightarrow Unterschied *Haliclona rosea*!

Funddaten**GPS 59°15.988'N 002°07.440'W**

Fundort: Tuquoy Bay, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 10.07.2001
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 5-10 m

Habitat: Auf Felssubstrat, an Laminarien

Assoziationen: zahlreiche Ophiuroidea im Wasserkanalsystem, räuberische Nudibranchi (*Jorunna tumentos*, puzzleartig verzahnt mit anderen Schwammarten auf Laminareinacouloide



EXTRAKTION**HZ016HACI***Haliclona cinerea* GRANT, 1826

Frischgewicht: 1710,8 g

Trockengewicht: 342,7 g

Rohextrakt: 91,7 g

Rohextraktfarbe: orange

Fraktionen: Hexan = 6,72 g

Ethylacetat = 1,40 g

Butanol = 3,49 g

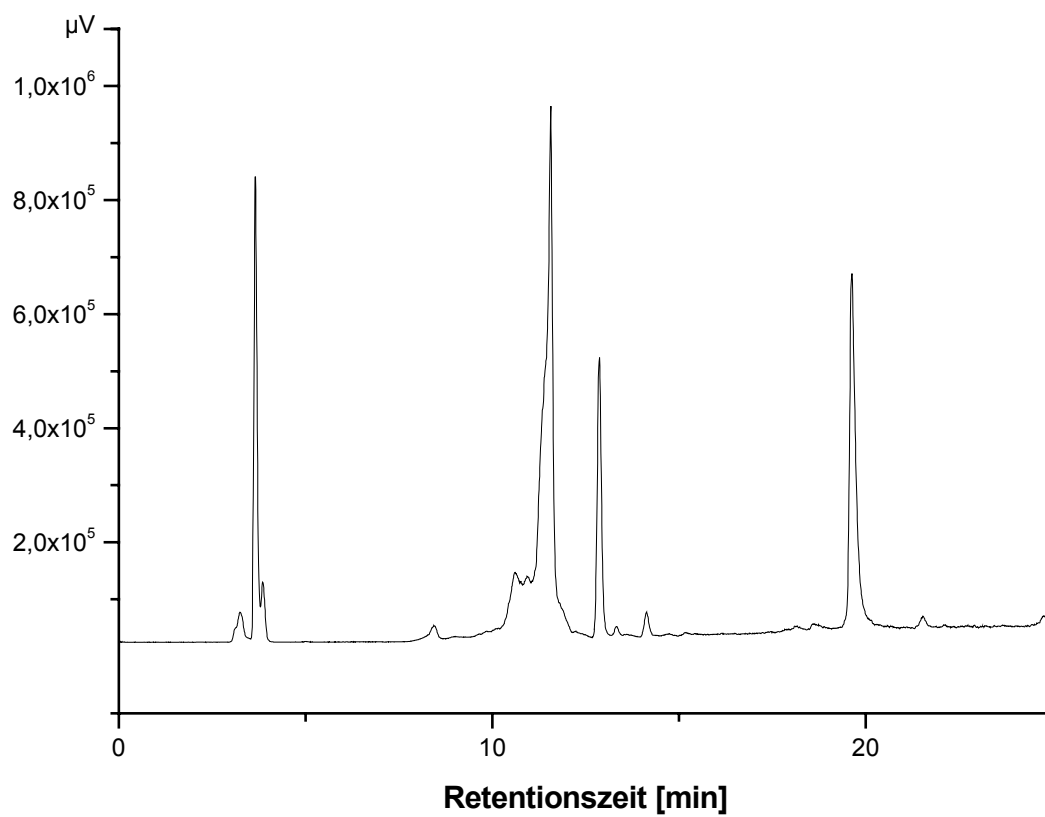
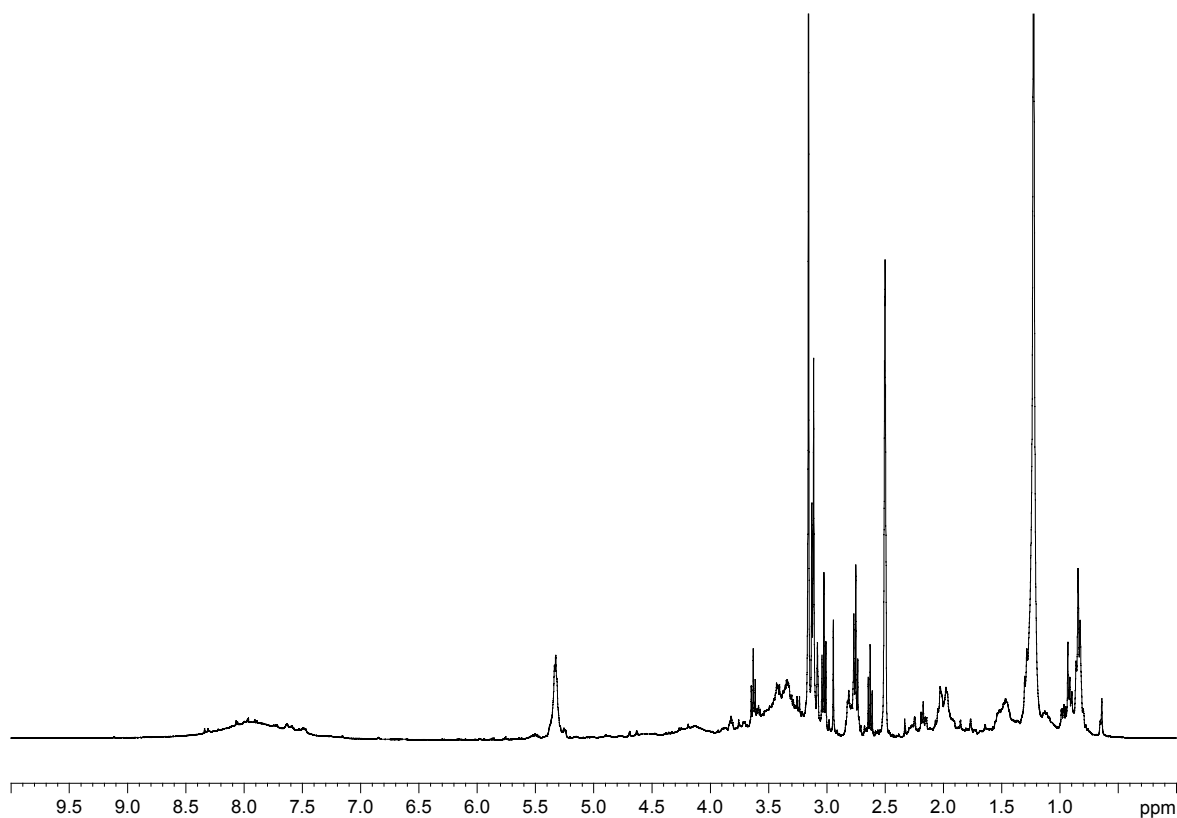
Wasser = 11,45 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ016HACI**

Keine weitere Bearbeitung

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ016HACI****NMR-Daten** nicht vorhanden**MS-Daten** nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Haliclona cinerea* (HZ016HACI)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Haliclona cinerea* (HZ016HACI)**

TAXONOMIE**HZ017MYFI*****Myxilla fimbriata*** BOWERBANK, 1864

Synonyme: *Isodictya fimbriata*, *Halichondria granulata*, *Dendoryx granulata*, *Hastatus granulatus*

Klassifizierung: Demospongiae, Poecilosclerida, Myxillidae

MORPHOLOGIE**HZ017MYFI****Habitus**

Wuchsform: dünne Kissen oder krustig
Oberfläche: locker, wenig rau
Oscula: klein, kaum erhoben
Farbe: orangerot; in Alkohol schwarz
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Tornot, Acanthostyl
Mikrosklenen: Chela, Sigma

Sonstiges

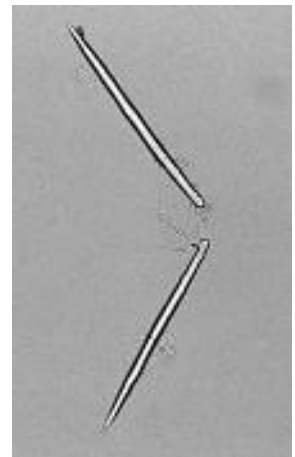
Ähnliche Art: *M. incrustans* (offene Oberfläche und Tornot), *M. rosacea*. *Esperiopsis fucorum*
Bemerkung: keine

FUNDDATEN**GPS 59°17.647'N 003°01.416'W**

Fundort: Red Nev, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 07.07.2001
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 5-20 m

Habitat: im Sublittoral an exponierten Standorten

Assoziationen: *Ophiothrix fragilis* und andere Ophiuroidea im Wasserkanalsystem, in Nachbarschaft zu Hydrzoa



EXTRAKTION**HZ017MYFI*****Myxilla fimbriata*** BOWERBANK, 1864

Frischgewicht: 506,7 g

Trockengewicht: 92,2 g

Rohextrakt: 27,0 g

Rohextraktfarbe: rotbraun

Fraktionen: Hexan = 3,70 g

Ethylacetat = 0,35 g

Butanol = 2,24 g

Wasser = 9,14 g

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen

ISOLIERUNG**HZ017MYFI****Ethylacetatfraktion**Trennmethode VLC (8 Fraktionen,
unzureichende Trennung)

Eingesetzte Menge: 302,3 mg

Ausbeute: 96%

Weiter Fraktionierung

Fraktion 9 Diol-HPLC (6 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 38,5 mg

Ausbeute: 61%

Ethylacetatfraktion

Trennmethode: Diol-HPLC (6 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 289,7 mg

Ausbeute: 82%

Fraktion 10 Diol HPLC (12 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 15,3mg

Ausbeute: 79%

Fraktion 11 Diol HPLC (5 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 21,6mg

Ausbeute: 83%

Butanolfraktion

Trennmethode: LH 20 (12 Fraktionen)

Eingesetzte Menge: 1,5g

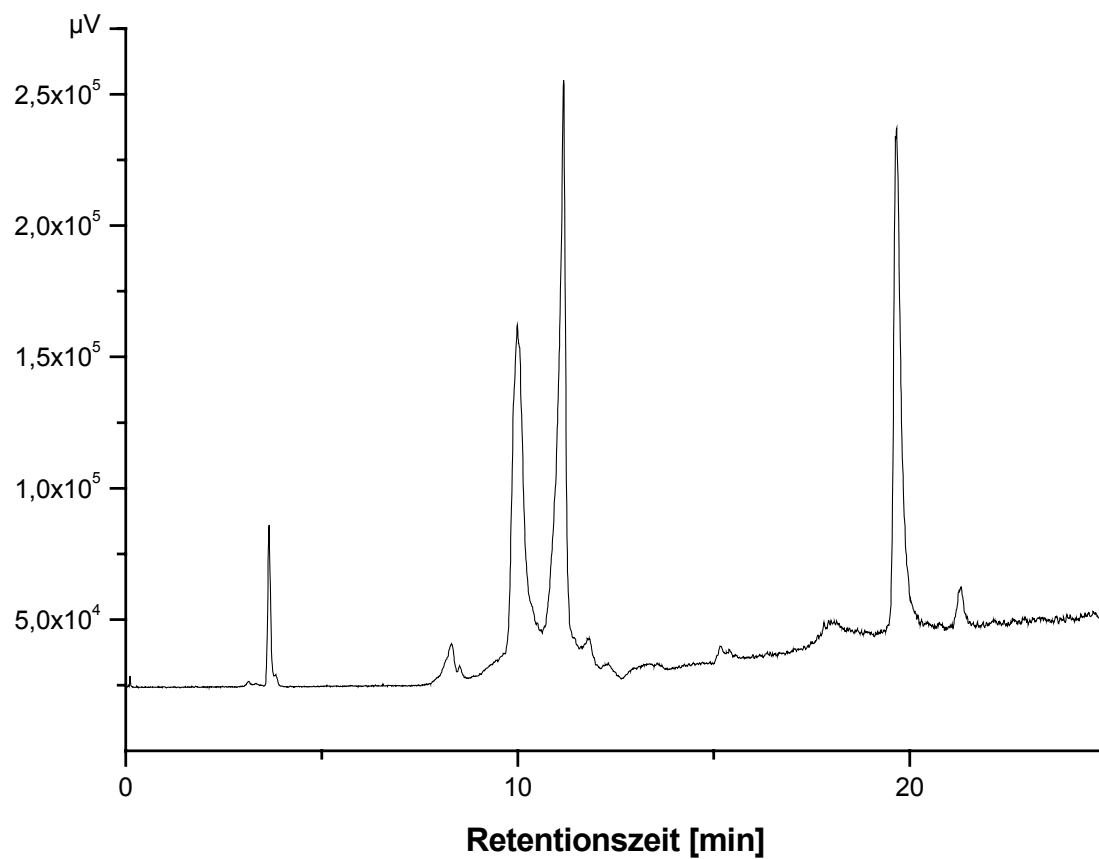
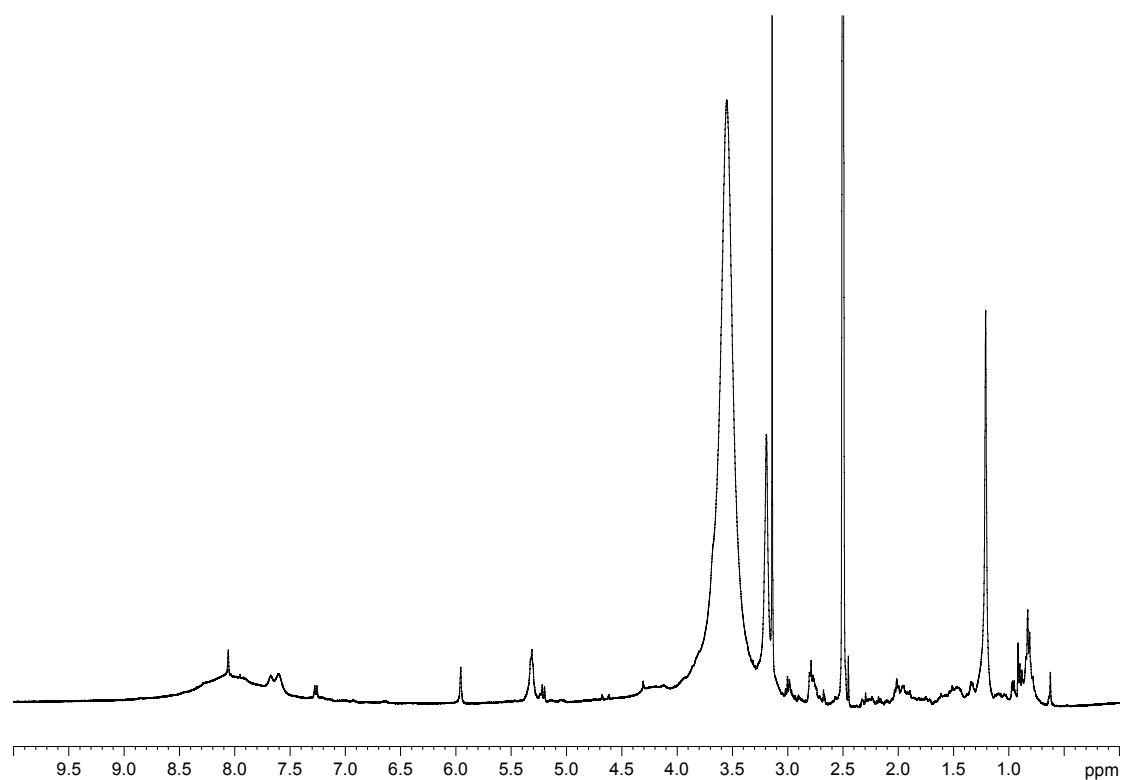
Ausbeute: 78%

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ017MYFI****NMR-Daten**

Probe	NMR-Experiment							
	¹ H	¹³ C	DEPT	COSY	¹³ C- HSQC	¹³ C- HMBC	¹⁵ N- HSQC	¹⁵ N- HMBC
HZ017ED4	+	+	-	+	+	+	+	+
HZ017ED5	+	+	+	+	+	+	-	-
HZ017ED6	+	+	-	+	+	+	-	-
HZ017BL11	+	-	-	+	+	+	-	-
HZ017BL12	+	+	+	+	+	+	+	+
HZ017BL2	+	-		+	+	+	-	-
HZ017BL10	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ017BL10D5	+	+	-	-	-	-	-	-
HZ017BL10D9	+	+	-	+	+	+	-	-

MS-Daten

Probe	m/z theoretisch	m/z experimentell	Summenformel	Δ ppm	Substanz
HZ017MYFI/B/L12	159,015	159,015	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	-	Allantoin
HZ017MYFI/E/D4	87,093	88,076	C ₄ H ₉ NO	0,5	Morpholin
HZ017MYFI/E/D5	-	103,107	-	0,08	-
HZ017MYFI/E/D6	-	211,123	-	2,6	-

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Myxilla fimbriata* (HZ017MYFI)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Myxilla fimbriata* (HZ017MYFI)**

TAXONOMIE**HZ018CLSP*****Clathrina clathrus*** SCHMIDT, 1864Synonyme: *Grantia clathrus*, *Ascetta clathrus*, *Leucosolenia clathrus****Clathrina coriacea*** MONTAGU, 1818Synonyme: *Grantia coriacea*, *Ascetta coriacea*, *Leucosolenia coriacea*, *Spongia coriacea*

Klassifizierung: Calcarea, Clathrinida, Clathrinidae

MORPHOLOGIE**HZ018CLSP****Habitus**

Wuchsform: verwachsenen Röhren, globulär
Oberfläche: glatt, weiche Konsistenz
Oscula: keine sichtbaren Oscula
Farbe: gelb oder weißlich; in Alkohol weiß
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Triactin
Mikrosklenen: nicht vorhanden

Sonstiges

Ähnliche Art: *Clathrina coriacea*
Bemerkung: keine

Habitus

Wuchsform: dünne, zartgebaute, kalkige Röhren
Oberfläche: bis auf vorstehende Spiculae glatt
Oscula: ein gemeinsames, rundes Osculum
Farbe: gelb oder weißlich; in Alkohol weiß
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Triactin
Mikrosklenen: nicht vorhanden

Sonstiges

Ähnliche Art: *Clathrina clathrus*
Bemerkung: keine

Funddaten**GPS 59°17.647'N 003°01.416'W**

Fundort: Red Nev, Westray (Orkney Inseln)
Datum: 07.07.2001
Sammelart: Tauchen
Tiefe: 17-21 m

Habitat: auf Felssubstrat an exponierten Standorten

Assoziationen: Rotalgen

EXTRAKTIONSDATEN**HZ018CLSP***Clathrina clathrus* SCHMIDT, 1864

Frischgewicht: 40,1 g

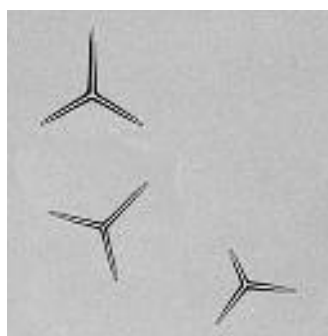
Trockengewicht: 5,6 g

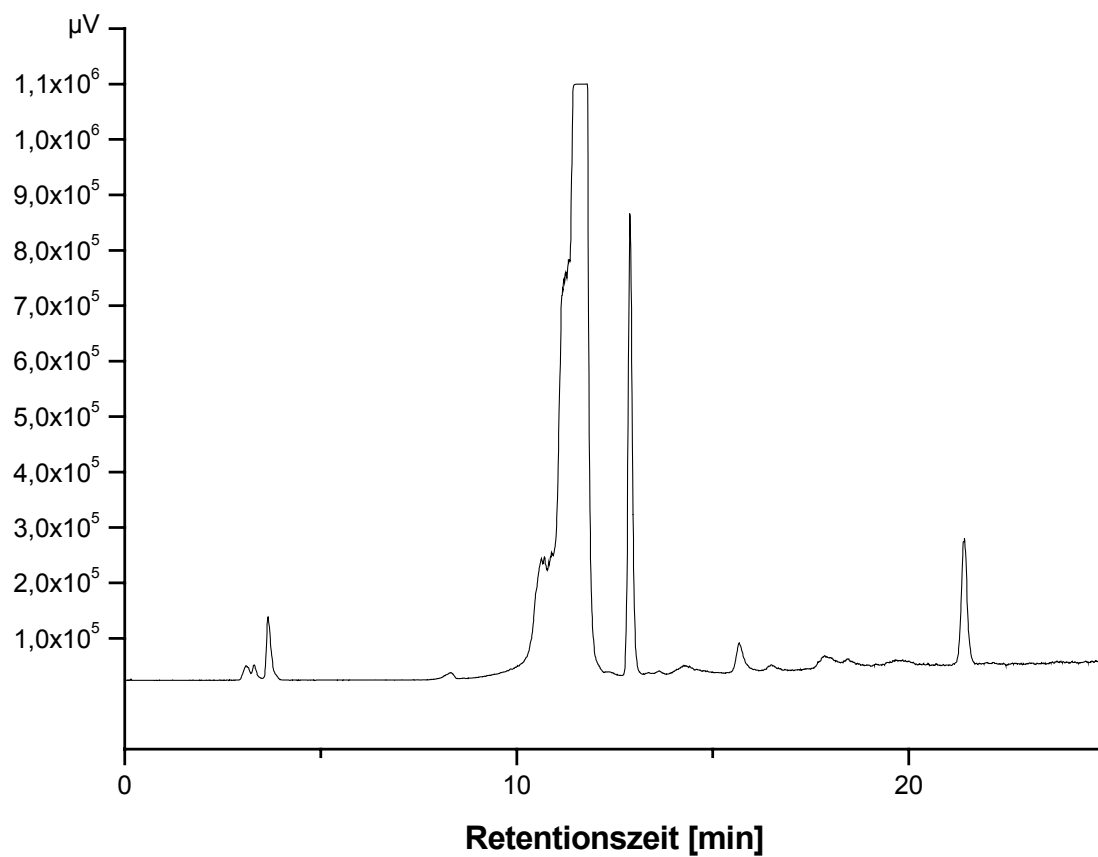
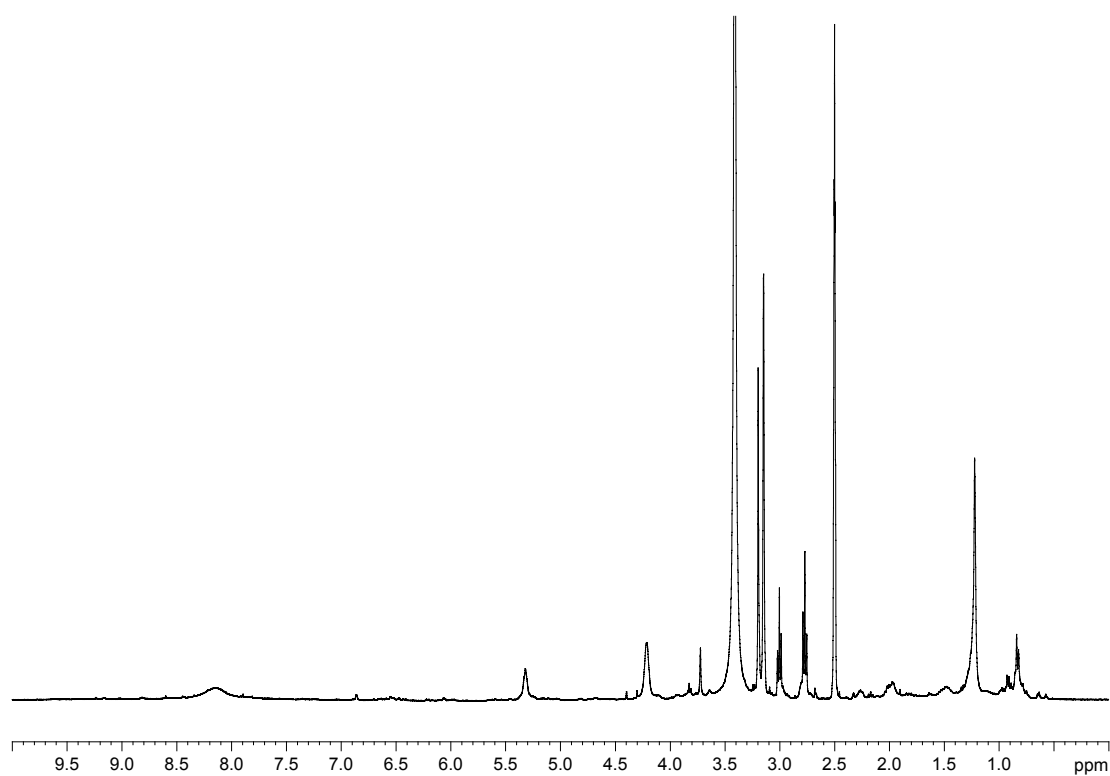
Rohextrakt: 0,9 g

Rohextraktfarbe: farblos

Fraktionen: Hexan = 0,04 g Ethylacetat = 0,02 g
Butanol = 0,50 g Wasser = 0,21 g*Screening:* ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für alle Fraktionen
HPLC mittels RP- und Diolsäule für alle Fraktionen**ISOLIERUNG****HZ018CLSP**

Keine weitere Bearbeitung

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ018CLSP****NMR-Daten** nicht vorhanden**MS-Daten** nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Clathrina* sp. (HZ018CLSP)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Clathrina* sp. (HZ018CLSP)**

TAXONOMIE**HZ019AXIN*****Axinella infundibuliformis*** LINNAEUS, 1759

Synonyme: *Spongia inf.*, *Isodyctia inf.*, *Tragosia inf.*, *Reniera palescens*, *Thrinacophora trichodragma*

Klassifizierung: Demospongiae, Halichondrida, Axinellidae

MORPHOLOGIE**HZ019AXIN****Habitus**

Wuchsform: trichterartig, lamellenartig, gerundete Enden, feste Konsistenz, bricht bei biegen
Oberfläche: punktiert
Oscula: klein, vereinzelt
Farbe: cremeweiß, cremegelb
Schleim: nicht vorhanden
Geruch: neutral

Nadeln

Makrosklenen: Styl, Oxea
Mikrosklenen: Trichodragma

Sonstiges

Ähnliche Art: *Phakellia ventilabrum* (Unterschiede: Spicula, Färbung, Konsistenz, Ränder)
Bemerkung: keine

FUNDDATEN**GPS 60°11.871'N 000°23.524'W**

Fundort: östlich von Bressay Island (Shetland Inseln)
Datum: 15.07.2001
Sammelart: Dredge
Tiefe: 50-90 m

Habitat: Tiefwasser, sandig, schlammiger Grund mit einzelnen Felsen, viel *Aphorrais* sp. (Mollusca) und Seefedern (Cnidaria, Octocorallia)

Assoziationen: mit *Phakellia ventilabrum* vergesellschaftet



EXTRAKTION**HZ019AXIN***Axinella infundibuliformis* LINNAEUS, 1759

Frischgewicht: 53,2 g
Trockengewicht: 7,5 g
Rohextrakt: 1,30 g
Rohextraktfarbe: bräunlich
Fraktionen: -

Screening: ^1H und ^{13}C – NMR Messungen für den Rohextrakt
HPLC mittels RP- und Diolsäule für den Rohextrakt

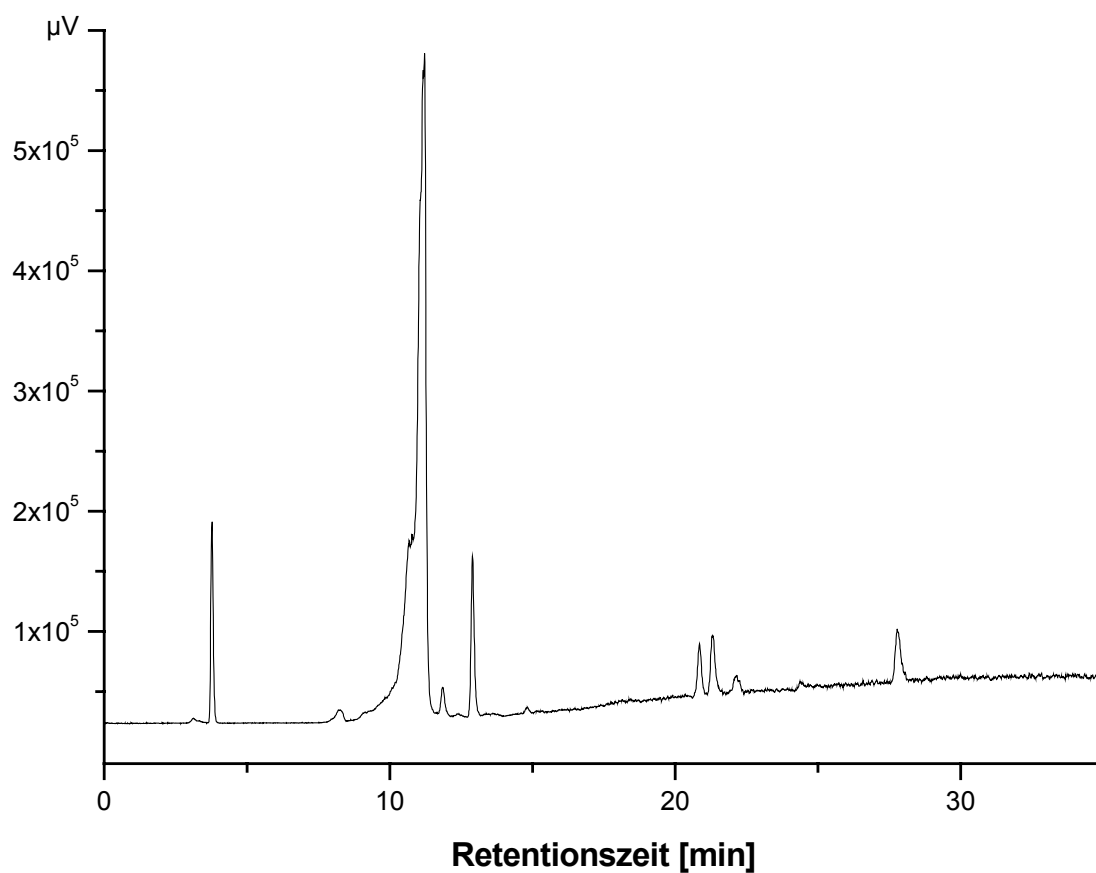
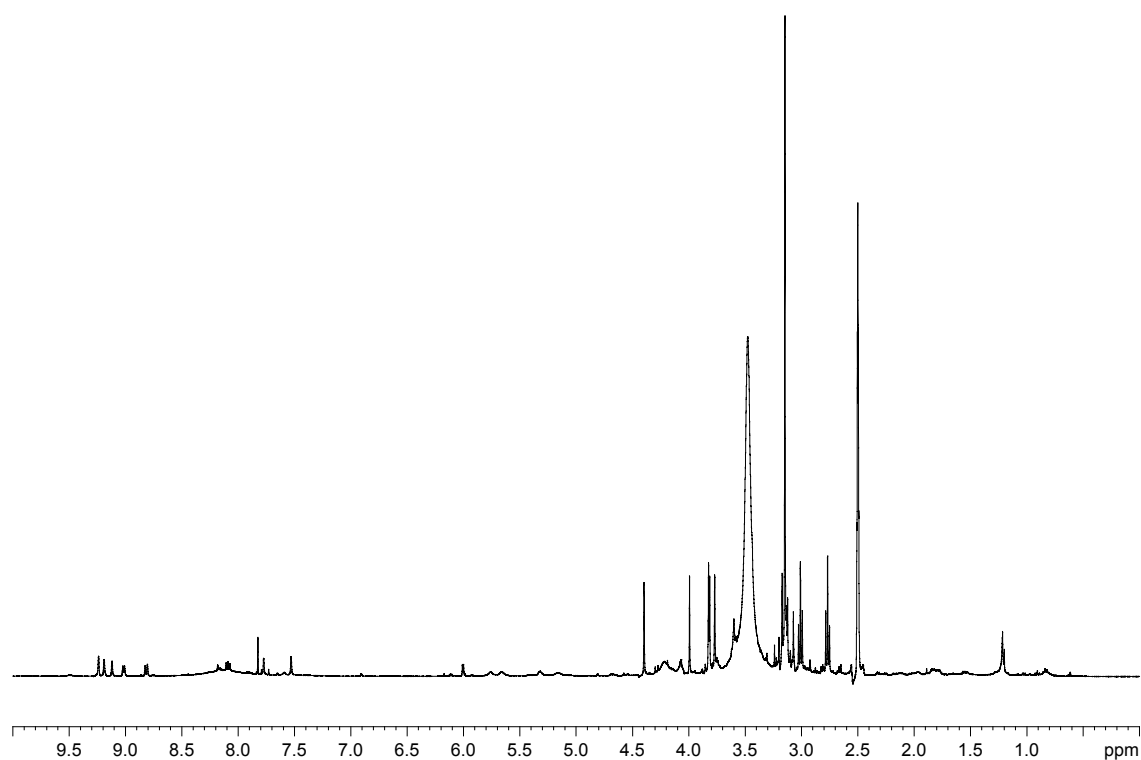
ISOLIERUNG**HZ019AXIN**

Keine weitere Bearbeitung

STRUKTURAUFKLÄRUNG**HZ019AXIN**

NMR-Daten nicht vorhanden

MS-Daten nicht vorhanden

HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Axinella infundibuliformis* (HZ019AXIN)**NMR-SPEKTRUM des Rohextraktes von *Axinella infundibuliformis* (HZ019AXIN)**

Extrakt ^{a)}	Algen- dichte ^{b)}	Aufwuchsorganismen				Assoziierte Organismen						
		Algen ^{c)}	Balanida	Hydrozoa	Bivalvia	Gastropoda	Copepoda	Amphipoda	Caprella sp.	Acari	Plathelminthes, Nemertini	Ophiuroidea
PAJO_B1	1					1		7				
PAJO_B2						1		4		1		
PAJO_B3						4		2		1		
PAJO_E1	1			1		2		2				
PAJO_E2							2	4				
PAJO_E3						1		12		1		
ESFU_R1	2					3	1	5				
ESFU_R2						5	1	1				
ESFU_R3						8	3	8		3		
SYCI_R1	1					6	3	10		1	1	
SYCI_R2						6	1	6		2		
SYCI_R3			2			3	0	0		1		
LECO_R1	2	1	6			2	2	4				
LECO_R2			3			4	2	5		5		
LECO_R3		1	6			17	2	9		2		
PHVE_H1	2					4	4	8		2		
PHVE_H2			1			8	5	15				
PHVE_H3						7	3	6				
ISPA_W1	1-2						1					
ISPA_W2						1	1	1				
ISPA_W3						3	3	2				
MYFI_B1	1-2	1				3	2					
MYFI_B2						1	2	9				
MYFI_B3						1	2	1		1		
Homarin_1	4		1			1						
Homarin_2						7	6	5				
Homarin_3						6		24				
Inosin_1	4	1				8	2	14		1		
Inosin_2			2			3	3	3	2			
Inosin_3						6	2	10	1			1
Trigonellin_1	4					1	4	16				
Trigonellin_2						11	3	8			3	
Trigonellin_3						6	2	8		2		
Kontrolle_1	3	2	2	1		4	6	3		2		
Kontrolle_2						5	17	1			3	
Kontrolle_3			1		1	5	11	13			1	
Kontrolle_4							1	6			1	
Kontrolle_5			1			8	4	16				
Kontrolle_6			1			2	2	8				

^{a)} Abkürzungen vgl. Tab. 2.1 ^{b)} bezogen auf die Besiedlung mit *Acrosiphiphonia* sp. ^{c)} Anzahl einzelner Algenindividuen

R=Rohextrakt, H=Hexanfraktion, E=Ethylacetatfraktion, B=Butanolfraction, W=Wasserfraktion

Extrakt ^{a)}	Algen- dichte ^{b)}	Aufwuchsorganismen				Assoziierte Organismen				
		Algen ^{c)}	Balanida	Hydrozoa	Laich ^{d)}	Gastropoda	Copepoda	Amphipoda	Acari	Plathelminthes, Nemertini,
CLCE_F1	3	7			2	7		3	1	
CLCE_F2	3	9				2		3		1
CLCE_F3	3	7		4		20			4	
CLCE_R1	3	8		1		4		24		
CLCE_R2	3	22		1	2	10		2		
CLCE_R3	3	37	1			17		1		
PAJO_F1	3	37				9		47	3	
PAJO_F2	3	91				3		40	1	
PAJO_F3	3	22				22		41	2	
PAJO_R1	3	8		6	6	1		2	1	
PAJO_R2	3	22	1			11		2		
PAJO_R3	3	26			3	23	2	3	1	
ESFU_R1	2	16			8	8			1	2
ESFU_R2	2	9				20		1		
ESFU_R3	3	2		1		27		2		
LECO_F1	3	8				7		91		
LECO_F2	3	12				4		20		
LECO_F3	3	55				5	1	42		
LECO_R1	2	45			8	8		5	4	
LECO_R2	2	28	2	9		10		4	4	
LECO_R3	2	41		*		6		6		
PHVE_R1	1	5		5	10	6	3	4	2	
PHVE_R2	1	4				3		1		1
PHVE_R3	2	34				15		6	2	
Kontrolle_1	1	12		5		1		43		
Kontrolle_2	1	4	1			7		31		
Kontrolle_3	1	7		4		4		3	4	
Kontrolle_4	1	27		6	2	6		2		
Trigonellin_1	1	3		15		1		2		
Trigonellin_2	1	3				6	1	1		
Trigonellin_3	1	6	1			3		1	2	

^{a)} Abkürzungen vgl. Tab. 2.1 ^{b)} bezogen auf die Besiedlung mit *Acrosiphiphonia* sp. ^{c)} Anzahl einzelner Algenindividuen
R=Rohextrakt, H=Hexanfraktion, E=Ethylacetatfraktion, B=Butanolfraktion, W=Wasserfraktion

^{d)} vermutlich Schneckenkegele

		^{a)} A	^{b)} P1	Proteobakterien																Gram positive Bakterien							Bacteroidetes		
		<i>Halobacterium salinarum</i>	<i>Planctomyces basiliensis</i>	<u>α</u>	<u>α</u>	<u>α</u>	<u>β</u>	<u>β</u>	<u>γ</u>	<u>γ</u>	<u>γ</u>	<u>γ</u>	<u>γ</u>	<u>γ</u>	<u>γ</u>	<u>γ</u>	<u>γ</u>	<u>γ</u>	<u>δ</u>	<u>Gram-positives Bakterium</u>	<u>High GC</u>	<u>High GC</u>	<u>High GC</u>	<u>High GC</u>	<u>Low GC</u>	<u>Low GC</u>	<u>Flavobacterium saccharophilum</u>	<u>Zobellia uliginosa</u>	<u>Cryptophaga sp. Ex. 9</u>
<i>Suberites suberia</i>	R																												
	H																												
	E																				*								
	B																												
	W																												
<i>Cliona celata</i>	R											*												**					
	H											*												*					
	E											*												*					
	B											*												*					
	W											*												*					
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	R									**	***	**	***								***								***
	H									**	**	**	**																
	E										***	***	***								***								
	B																												
	W																												***
<i>Esperiopsis furorum</i>	R											*												***					
	H											*	**																
	E							**		**	*	***																	
	B							**			*	**																	
	W										**																		
<i>Sycon ciliatum</i>	R							**			**													***					
	H										**	**																	
	E											**	**																
	B										**	**	**																
	W						**																						
<i>Leucosolenia complicata</i>	R										**	**	**											***					
	H										**	**	**											***					
	E								*	**	**	**																	
	B								*	*	**	**																	
	W									*	**	**																	
<i>Phakellia ventrilabrum</i>	R							**		*	**	**																	
	H							*		*	*	**																	
	E									*	*	**																	
	B									*	**	**																	
	W						**					**																	
<i>Myxilla rosacea</i>	R					**					**																		
	H										**																		
	E										**																		
	B										**	**																	
	W										**	**																	
<i>Myxilla incrustans</i>	R										**										***								
	H										**																		
	E						*		**		**	**																	
	B						*		**		**	**																	
	W					**					**	**																	
<i>Isodictya palmata</i>	R										**																		
	H										**													***		**			
	E										**													***					
	B						**				**	**																	
	W										**	**												***					
<i>Halichondria panicea</i>	R																												
	H																												
	E																												
	B				*																	**							
	W																												
<i>Haliclona cinerea</i>	R																												
	H																							**					
	E																												
	B																												
	W																												
<i>Myxilla fimbriata</i>	R									**		***																	
	H									**		***												*					
	E																												
	B																												
	W																							***					
<i>Haliclona rosea</i>	C																												
<i>Tetilla zethlandica</i>	C																							*					
<i>Clathrina sp.</i>	C																							**					
<i>Axinella infundibuliformis</i>	C																							*					

R=Rohextrakt, H=Hexanfraktion, E=Ethylacetatfraktion, B=Butanolfraktion, W=Wasserfraktion, fett und unterstrichen: aus *Halichondria panicea* isoliert; unterstrichen: marine Arten;

a)A=Archaea b)P=Planc Hemmeffekte: *** stark, ** mittel und * schwach, leere Felder bedeuten keine Aktivität

			Proteobakterien						Gram positive Bakterien							Bact.	
			α	β	β	γ	γ	γ	γ	γ	High GC		Low GC				
			Roseobacter litoralis	Aquaspirillum psychrophilum	Comamonas testosteroni	Acinetobacter calcoaceticus	Vibrio sp.	Vibrio fischeri	Vibrio harveyi	Pseudomonas tetradonis	Micrococcus sp.	Microbacterium barkeri	Streptomyces purpureus	Bacillus badius	Bacillus subtilis	Cytophaga sp. Ex. 9	
Astrophorida	Pachymatisma johnstonia	R	4,52				2,15	0,9	2,0	3,3	4,50					2,48	
		H					2,71		0,6								
		E	4,69				3,61		4,2	5,1	6,20		6,2			2,93	
		B														7,88	
		W														3,40	
Hadromerida	Cliona celata	R							0,9			1,00					
		H							0,6								
		E							0,9								
		B							0,4								
		W							0,6								
	Suberites suberia	R					2,33										
		H					2,33										
		E					2,33					6,03					
B						2,33											
	W					2,33											
Spirophorida	Tetilla zetlandica	R										5,64					
Halichondrida	Axinella infundibuliformis	R										2,89					
	Halichondria panicea	R										3,76					
		H										4,92					
		E															
		B		2,60										2,6			
		W															
	Phakellia ventilabrum	R				1,70	2,51	0,7	1,2			15,45					
		H					2,30	0,4	0,7			17,93					
		E					2,23	0,4									
		B					2,30		1,0								
	W				1,20	2,32											
Haplosclerida	Haliclona cinerea	R										4,55					
		H										3,86					
		E										6,81					
		B										2,54					
		W															
	Haliclona rosea	R															
Poecilosclerida	Esperiopsis fucorum	R							0,9			11,90		1,72			
		H					2,04		0,5						7,22		
		E				1,00	2,26	1,0	0,5					1,84			
		B				1,40	1,97		0,5								
		W							1,8								
	Myxilla fimbriata	R							1,4			4,19					
		H							1,6			3,22					
		E						0,7				3,98					
		B						1,0				4,29					
		W										3,62					
	Myxilla rosacea	R			1,84		2,15		2,3								
		H					2,25										
		E					2,14										
		B					2,15										
		W		3,00			2,52										
	Myxilla incrustans	R					2,21						4,4				
H						2,21											
E						2,17											
B						1,94											
W					1,00	2,07											
Isodictya palmata	R							1,7									
	H							1,2			6,13				2,20		
	E							1,1			4,15						
	B				1,60			1,2									
	W							1,8			3,50						
Leucosolenida	Sycon ciliatum	R				1,00			1,5								
		H					1,40		1,0								
		E					1,62										
		B					1,62		1,3								
		W				1,50											
	Leucosolenia complicata	R					2,26		1,2			10,40					
		H					2,48		1,1								
		E					1,66	0,4	1,5								
		B					2,56	0,8	0,8								
		W					2,51		0,8								
Clathrinida	Clathrina sp.	R										1,75					

Hemmkonzentration 400 µg

Hemmkonzentration 200 µg

Hemmkonzentration 100 µg

R: Rohextrakt H: Hexanphase

E: Essigesterphase

B: Butanolphase

W: Wasserphase

	Zutaten	Medium				
		2216E	Nr.1	Nr. 1M	Nr. 790	Nr. 222
	(NH ₄) ₂ SO ₄				2	
	CaCl ₂ *2H ₂ O					
	CaCO ₃					
	<i>Casaminoacids</i>					
	Caseinpepton					
	Casiton					2,5
	FeSO ₄ * 7H ₂ O					
	^{a)} Glucose					
	Hefe	1			1	
	KCl					
	K ₂ HPO ₄					0,25
	<i>Meat Extrakt</i>		1	1		
	MgSO ₄ * 7H ₂ O				2	0,5
	MnSO ₄					
	Malzextrakt					
	Na-Citrat					
	NaCl			5		
	Pepton	5	5	5	10	
	^{a)} Raffinose					1
	^{a)} Sucrose					1
	^{a)} Galactose					1
	lösliche Stärke					5
	destilliertes Wasser [ml]	250	1000	1000	1000	1000
	gealtertes Seewasser [ml]	750	0	0	0	0
	^{a)} Glucose	0	0	0	0	0
	^{a)} Raffinose	0	0	0	0	5
	^{a)} Sucrose	0	0	0	0	5
	^{a)} Galactose	0	0	0	0	5
	0,1 M TRIS-HCl pH 7,5	0	0	0	0	0
	Vitamin-Lösung	0	0	0	0	0
	Huttner Metalle	0	0	0	0	0
	pH	7,6	7	7	7	7,4
Flüssig	Agar	0	0	0	0	
Fest	Agar	15	15	15	15	
Weichagar	Agar	6	6	6	6	

Soweit nicht anders angegeben sind alle Angaben in Gramm (g)

^{a)}steril filtriert (0,2 g/ml)

	Zutaten	Medium				
		Nr. 67	Nr. 54	Nr. 53	Nr. 97	Nr. 65
	(NH ₄) ₂ SO ₄					
	CaCl ₂ *2H ₂ O	1,36				
	CaCO ₃		20			2
	<i>Casaminoacids</i>				7,5	
	Caseinpepton			10		
	Casiton	3				
	FeSO ₄ * 7H ₂ O				0,05	
	^{a)} Glucose		20	5		4
	Hefe	1	10	5	10	4
	KCl				2	
	K ₂ HPO ₄					
	<i>Meat Extrakt</i>					
	MgSO ₄ * 7H ₂ O				20	
	MnSO ₄				0,2 mg	
	Malzextrakt					10
	Na-Citrat				3	
	NaCl			5	250	
	Pepton					
	^{a)} Raffinose					
	^{a)} Sucrose					
	^{a)} Galactose					
	lösliche Stärke					
	destilliertes Wasser [ml]	1000	900	975	1000	1000
	gealtertes Seewasser [ml]	0	0	0	0	0
	^{a)} Glucose	0	100	25	0	20
	^{a)} Raffinose	0	0	0	0	0
	^{a)} Sucrose	0	0	0	0	0
	^{a)} Galactose	0	0	0	0	0
	0,1 M TRIS-HCl pH 7,5	0	0	0	0	0
	Vitamin-Lösung	0	0	0	0	0
	Huttner Metalle	0	0	0	0	0
	pH	7,2		7,2	7,4	7,2
Flüssig	Agar	0	0	0	0	0
Fest	Agar	15	15	15	15	15
Weichagar	Agar	6	6	6	6	6

Soweit nicht anders angegeben sind alle Angaben in Gramm (g)

^{a)}steril filtriert (0,2 g/ml)

Diese Artenliste in alphabetischer Reihenfolge soll der Orientierung dienen (kA = keine Angaben auffindbar).

Gattung	Art	Deutsche Bezeichnung	Phylum	Klasse	Erstbestimmer, Jahr
<i>Abietinaria</i>	<i>abietina</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Hydrozoa	Linnaeus, 1758
<i>Acanthella</i>	sp.	Schwämme	Porifera	Demospongiae	-
<i>Acrosiphonia</i>	sp.	Grünalgen	Chlorophycota	Chlorophyceae	-
<i>Actinia</i>	<i>equina</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	Linnaeus, 1758
<i>Actinothoe</i>	<i>sphyrodeta</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	Gosse, 1858
<i>Agelas</i>	<i>dispar</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Dichassaing & Michelotti, 1864
<i>Adamsia</i>	<i>carciniopados</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	Otto, 1823
<i>Alcyonidium</i>	sp.	Moostierchen	Bryozoa	Ascidacea	-
<i>Alcyonium</i>	<i>digitatum</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	Linnaeus, 1758
<i>Allaria</i>	<i>esculata</i>	Braunalge	Phaeophycota	Phaeophyceae	Greville, 1830
<i>Anemonia</i>	sp.	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	-
<i>Anomia</i>	<i>ephippium</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	Linnaeus, 1758
<i>Antho</i>	<i>involvens</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Schmidt, 1864
<i>Aphorrais</i>	<i>pespelecani</i>	Weichtiere	Mollusca	Gastropoda	Linnaeus, 1758
<i>Aphorrais</i>	<i>serresianus</i>	Weichtiere	Mollusca	Gastropoda	Michaud, 1828
<i>Aplidium</i>	<i>punctum</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Giard, 1872
<i>Aplysilla</i>	sp.	Schwämme	Porifera	Demospongiae	-
<i>Archidoris</i>	<i>pseudoargus</i>	Weichtiere	Mollusca	Gastropoda	Rapp, 1824
<i>Arenosclera</i>	<i>brasiliensis</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Muricy & Ribeiro, 1999
<i>Artemia</i>	<i>salina</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Leach, 1819
<i>Ascidia</i>	<i>mentula</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Müller, 1776
<i>Ascidella</i>	<i>aspersa</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Müller, 1776

Gattung	Art	Deutsche Bezeichnung	Phylum	Klasse	Erstbestimmer, Jahr
<i>Ascidella</i>	<i>scabra</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Müller, 1776
<i>Astarte</i>	<i>sulcata</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	da Costa, 1758
<i>Asterias</i>	<i>rubens</i>	Stachelhäuter	Echinodermata	Asteroidea	Linnaeus, 1758
<i>Axinella</i>	<i>infundibuliformis</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Linnaeus, 1767
<i>Balanus</i>	<i>balanoides</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Linnaeus, 1767
<i>Bicellariella</i>	<i>ciliata</i>	Moostierchen	Bryozoa	Ascidacea	Linnaeus, 1758
<i>Botryllus</i>	<i>schlosseri</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Pallas, 1766
<i>Branchiosyllis</i>	sp.	Borstenwürmer	Annelida	Polychaeta	-
<i>Bugula</i>	sp.	Moostierchen	Bryozoa	Gymnolaemata	-
<i>Calliostoma</i>	<i>zizyphinum</i>	Weichtiere	Mollusca	Gastropoda	Linnaeus, 1758
<i>Callopora</i>	<i>lineata</i>	Moostierchen	Bryozoa	Gymnolaemata	Linnaeus, 1767
<i>Cancer</i>	<i>pagurus</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Linnaeus, 1758
<i>Caprella</i>	sp.	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	-
<i>Carcinus</i>	<i>maenas</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Linnaeus, 1758
<i>Cerianthus</i>	sp.	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	-
<i>Chlamys</i>	<i>varia</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	Linnaeus, 1758
<i>Ciona</i>	<i>intestinalis</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Linnaeus, 1758
<i>Circeis</i>	<i>spirillum</i>	Borstenwürmer	Annelida	Polychaeta	Linnaeus, 1758
<i>Clathria</i>	<i>gradilis</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Topsent, 1925
<i>Clathrina</i>	<i>clathrus</i>	Schwämme	Porifera	Calcarea	Schmidt, 1846
<i>Clathrina</i>	<i>coriacea</i>	Schwämme	Porifera	Calcarea	Montagu, 1818
<i>Clavelina</i>	<i>lepadiformis</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Müller, 1776
<i>Cliona</i>	<i>celata</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Grant, 1826
<i>Corynactis</i>	<i>viridis</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	Allman, 1846

Gattung	Art	Deutsche Bezeichnung	Phylum	Klasse	Erstbestimmer, Jahr
<i>Crisia</i>	<i>aculeata</i>	Moostierchen	Bryozoa	Stenolaemata	Hassall, 1841
<i>Crisia</i>	<i>eburnea</i>	Moostierchen	Bryozoa	Stenolaemata	Linnaeus, 1758
<i>Cryptothethya</i>	<i>crypta</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	
<i>Didemnum</i>	<i>maculosum</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Milne-Edwards, 1841
<i>Diphasia</i>	<i>rosacea</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Hydrozoa	Linnaeus, 1758
<i>Diplosoma</i>	sp.	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	-
<i>Discodermia</i>	<i>dissoluta</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	kA
<i>Dysidea</i>	sp.	Schwämme	Porifera	Demospongiae	-
<i>Ensis</i>	sp.	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	-
<i>Erylus</i>	<i>lendenfeldi</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Sollas, 1888
<i>Esperiopsis</i>	<i>fucorum</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Esper, 1794
<i>Euspongia</i>	<i>officinalis</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	
<i>Galathea</i>	<i>squamifera</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Leach, 1814
<i>Gelidium</i>	sp.	Rotalgen	Rhodophycota	Rhodophyceae	-
<i>Glycymeris</i>	<i>glycymeris</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	Linnaeus, 1758
<i>Grantia</i>	<i>compressa</i>	Schwämme	Porifera	Calcarea	Fabricius, 1780
<i>Halichondria</i>	<i>okaida</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	kA
<i>Halecium</i>	sp.	Nesseltiere	Cnidaria	Hydrozoa	-
<i>Halichondria</i>	<i>bowerbanki</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Burton, 1930
<i>Halichondria</i>	<i>panicea</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Pallas, 1766
<i>Haliclona</i>	<i>cinerea</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Bowerbank, 1866
<i>Haliclona</i>	<i>heterofimbrosa</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	kA
<i>Haliclona</i>	<i>hogarthi</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	kA
<i>Haliclona</i>	<i>oculata</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Pallas, 1766

Gattung	Art	Deutsche Bezeichnung	Phylum	Klasse	Erstbestimmer, Jahr
<i>Haliclona</i>	<i>rosea</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Grant, 1826
<i>Haliclona</i>	<i>viscosa</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Topsent, 1988
<i>Halisarca</i>	<i>dujardini</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Johnston, 1842
<i>Haplosyllis</i>	<i>spongicola</i>	Borstenwürmer	Annelida	Polychaeta	Grube, 1855
<i>Helcion</i>	<i>pellucidum</i>	Weichtiere	Mollusca	Gastropoda	Linnaeus, 1758
<i>Hiatella</i>	<i>artica</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	Linnaeus, 1767
<i>Hippospongia</i>	<i>communis</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Lamarck, 1813
<i>Homarus</i>	<i>gammarus</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Linnaeus, 1758
<i>Hyas</i>	<i>araneus</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Linnaeus, 1758
<i>Hydractinia</i>	<i>echinata</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Hydrozoa	Fleming, 1823
<i>Hymenacion</i>	<i>kitchingi</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Burton, 1935
<i>Iophon</i>	<i>hyndmani</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Bowerbank, 1864
<i>Isodictya</i>	<i>palmata</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Ellis & Solander, 1786
<i>Isodictia</i>	<i>erinacea</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	kA
<i>Jorunna</i>	<i>tumentosa</i>	Weichtiere	Mollusca	Gastropoda	Cuvier, 1804
<i>Laminaria</i>	<i>hyperborea</i>	Braunalgen	Phaeophycota	Phaeophyceae	Foslie, 1884
<i>Laminaria</i>	<i>digitata</i>	Braunalgen	Phaeophycota	Phaeophyceae	Lamouroux, 1813
<i>Laomedea</i>	<i>flexuosa</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Hydrozoa	Alder, 1857
<i>Leucetta</i>	sp.	Schwämme	Porifera	Calcarea	-
<i>Leucosolenia</i>	<i>variabilis</i>	Schwämme	Porifera	Calcarea	Haeckel, 1870
<i>Leucosolenia</i>	<i>complicata</i>	Schwämme	Porifera	Calcarea	Montagu, 1818
<i>Liocarcinus</i>	<i>puber</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Linnaeus, 1767
<i>Lithodes</i>	<i>maja</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Linnaeus, 1758
<i>Luffariella</i>	<i>variabilis</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	de Silva & Scheuer 1980

Gattung	Art	Deutsche Bezeichnung	Phylum	Klasse	Erstbestimmer, Jahr
<i>Luidia</i>	<i>sarsi</i>	Stachelhäuter	Echinodermata	Asteroidea	Düben & Koren, 1845
<i>Lyssodendorynx</i>	sp.	Schwämme	Porifera	Demospongiae	-
<i>Metridium</i>	<i>senile</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	Linnaeus, 1767
<i>Modiolula</i>	<i>phaseolina</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	Philippi, 1844
<i>Modiolus</i>	<i>modiolus</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	Linnaeus, 1758
<i>Musculus</i>	sp.	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	-
<i>Mycale</i>	<i>rotalis</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Bowerbank, 1874
<i>Mycale</i>	<i>laevis</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Carter, 1882
<i>Mytilus</i>	<i>edulis</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	Linnaeus, 1758
<i>Myxilla</i>	<i>fimbriata</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Bowerbank, 1866
<i>Myxilla</i>	<i>incrustans</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Johnston, 1842
<i>Myxilla</i>	<i>rosacea</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Liebkühn, 1895
<i>Niphates</i>	sp.	Schwämme	Porifera	Demospongiae	-
<i>Obelia</i>	<i>geniculata</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Hydrozoa	Linnaeus, 1758
<i>Ophiopholis</i>	<i>aculeata</i>	Stachelhäuter	Echinodermata	Ophiuroidea	Linnaeus, 1767
<i>Ophiothrix</i>	sp.	Stachelhäuter	Echinodermata	Asteroidea	-
<i>Ophiothrix</i>	<i>fragilis</i>	Stachelhäuter	Echinodermata	Ophiuroidea	Abildgaard, 1789
<i>Oscarella</i>	<i>lobularis</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Schmidt, 1862
<i>Ostrea</i>	<i>edulis</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	Linnaeus, 1758
<i>Pachymatisma</i>	<i>johnstonia</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Bowerbank, 1842
<i>Pagurus</i>	<i>bernhardus</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Linnaeus, 1758
<i>Pagurus</i>	<i>prideaux</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Leach, 1815
<i>Parajassa</i>	<i>pelagica</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Leach, 1814
<i>Pecten</i>	<i>maximus</i>	Weichtiere	Mollusca	Bivalvia	Linnaeus, 1758

Gattung	Art	Deutsche Bezeichnung	Phylum	Klasse	Erstbestimmer, Jahr
<i>Petrosia</i>	<i>contignata</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Thiele, 1899
<i>Phakellia</i>	<i>ventilabrum</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Linnaeus, 1767
<i>Phakellia</i>	<i>constata</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	kA
<i>Pheronema</i>	<i>carpenteria</i>	Schwämme	Porifera	Hexactinellida	Thomson, 1869
<i>Phymatholiton</i>	<i>calcareum</i>	Krustenrotalgen	Rhodophycota	Rhodophyceae	Pallas
<i>Plocamium</i>	<i>cartilagineum</i>	Rotalgen	Rhodophycota	Rhodophyceae	Dixon, 1967
<i>Plumularia</i>	sp.	Nesseltiere	Cnidaria	Hydrozoa	-
<i>Poecillastra</i>	<i>compressa</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Bowerbank, 1866
<i>Polyclinum</i>	<i>aurantium</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Milne-Edwards, 1841
<i>Polymastia</i>	<i>mamillaris</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Müller, 1806
<i>Pomatoceros</i>	<i>triqueter</i>	Borstenwürmer	Annelida	Polychaeta	Linnaeus, 1767
<i>Pseudosuberites</i>	<i>sulphureus</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Bean, 1866
<i>Rostanga</i>	<i>rubra</i>	Weichtiere	Mollusca	Gastropoda	Risso, 1818
<i>Sagartia</i>	sp.	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	-
<i>Sagartiogeton</i>	sp.	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	-
<i>Scrupocellaria</i>	<i>scruposa</i>	Moostierchen	Bryozoa	Ascidacea	Linnaeus, 1758
<i>Semibalanus</i>	<i>balanoides</i>	Krebstiere	Arthropoda	Crustacea	Linnaeus, 1766
<i>Sertularia</i>	sp.	Nesseltiere	Cnidaria	Hydrozoa	-
<i>Spheciospongia</i>	<i>vesparium</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Lamarck, 1814
<i>Spinther</i>	<i>oniscoides</i>	Borstenwürmer	Annelida	Polychaeta	Johnston, 1844
<i>Spongilla</i>	<i>lacustris</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Linnaeus, 1758
<i>Stelligera</i>	<i>stuposa</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Ellis & Solander, 1786
<i>Suberites</i>	<i>ficus</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Esper, 1794
<i>Suberites</i>	<i>virgultosus</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Johnston, 1842

Gattung	Art	Deutsche Bezeichnung	Phylum	Klasse	Erstbestimmer, Jahr
<i>Suberites</i>	<i>suberia</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Montagu, 1818
<i>Sycon</i>	<i>ciliatum</i>	Schwämme	Porifera	Calcarea	Fabricius, 1780
<i>Tetilla</i>	<i>zetlandica</i>	Schwämme	Porifera	Demospongiae	Carter, 1872
<i>Trididemnum</i>	<i>cereum</i>	Manteltiere	Chordata	Ascidacea	Giard, 1872
<i>Tubularia</i>	<i>indivisa</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Hydrozoa	Linnaeus, 1758
<i>Typosyllis</i>	<i>gracilis</i>	Borstenwürmer	Annelida	Polychaeta	Grube, 1840
<i>Typosyllis</i>	<i>armillaris</i>	Borstenwürmer	Annelida	Polychaeta	O.F.Müller, 1776
<i>Urticina</i>	<i>felina</i>	Nesseltiere	Cnidaria	Anthozoa	Linnaeus, 1767
<i>Xestosponiga</i>	sp.	Schwämme	Porifera	Demospongiae	-

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Nachname	Zanker
Vorname	Heidi Annette
Geburtsdatum	24.05.1976
Geburtsort	Geislingen/Steige (Baden-Württemberg)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch

SCHULAUSSBILDUNG

August 1982 – Juli 1986	Grundschule Gruibingen
August 1986 – Juni 1992	Realschule Deggingen
August 1992 – Juni 1995	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Göppingen

STUDIUM

Oktober 1995 – Januar 2001	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Ulm
Oktober 1998	Vordiplom im Fach Biologie
Februar & März 2000	Diplomprüfung in den Fächern Ökologie, Spezielle Zoologie, Botanik, Analytische Chemie
Januar 2001	Diplom in Biologie
März 2000 - Januar 2001	Diplomarbeit: „Räuber-Beute-Beziehungen zwischen Echinodermaten der Nordsee und ihrer Beute“ in der Abteilung Experimentelle Ökologie, Universität Ulm

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT

01.02.2001 – 15.06.2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis "Chemie mariner Spuren- und Naturstoffe" am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, Doktorarbeit zum Thema: „Chemische und ökologische Studien an Nordseeschwämmen“
10/2003 – 03/2004	Forschungstaucherin und Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Dallmann-Labor des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung auf der Station Jubany, Antarktis
10/1999 – 02/2001	Wissenschaftliche Hilfskraft im „Botanischen Anfängerpraktikum“ Abteilung Allgemeine & Systematische Botanik, Universität Ulm
04/2000 – 07/2000	Wissenschaftliche Hilfskraft bei den „Tierbestimmungsübungen“ Abteilung Morphologie und Ökologie der Tiere, Universität Ulm
10/2000 – 02/2000	Wissenschaftliche Hilfskraft im „Zoologischen Anfängerpraktikum“ Abteilung Morphologie & Ökologie der Tiere, Universität Ulm
02/1999 - 04/1999	Wissenschaftliche Hilfskraft zur Zucht mariner Crustaceen; Biologische Anstalt Helgoland
10/1998 – 03/1999	Studentische Hilfskraft zur Betreuung von Meerwasseraquarien; Abteilung Allgemeine Zoologie & Endokrinologie, Universität Ulm

EXKURSIONEN UND FORSCHUNGSREISEN

Im Rahmen der Promotion:

Juli 2003	Teilnahme an einer Forschungsfahrt zu den Bahamas mit RV Seward Johnson (Harbour Branch Oceanographic Institution); Untersuchungen zur chemischen Ökologie von Schwämmen
Mai 2003	Teilnahme an einer Forschungsfahrt zu den Orkney- und Shetland Inseln mit der FS Heincke; Freiland- und Laborversuche zur chemischen Ökologie von Schwämmen
Juni & Juli 2001	Teilnahme an einer Forschungsfahrt zu den Orkney- und Shetlandinseln mit der FS Heincke; Untersuchungen zur chemischen Ökologie von Schwämmen

Im Rahmen des Studiums:

April 2000	Tutorin bei der Meeresbiologischen Exkursion der Universität Ulm nach Helgoland
Juli 1998	Teilnahme an einer Meeresbiologische Exkursion der Universität Ulm nach Helgoland
April 1998	Teilnahme an der Großen Meeresbiologischen Exkursion nach Roscoff (Bretagne, Frankreich)